

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

LUANNA ABÍLIO DINIZ MELQUIADES DE MEDEIROS

**DESENVOLVIMENTO DE ESFERAS DE QUITOSANA/ *DYSPHANIA*
AMBROSIOIDES (L.) MOSYAKIN & CLEMANTS PARA APLICAÇÃO COMO
BIOMATERIAL**

CAMPINA GRANDE - PB

2016

LUANNA ABÍLIO DINIZ MELQUIADES DE MEDEIROS

**DESENVOLVIMENTO DE ESFERAS DE QUITOSANA/ *DYSPHANIA*
AMBROSIOIDES (L.) MOSYAKIN & CLEMANTS PARA APLICAÇÃO COMO
BIOMATERIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.**

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

CAMPINA GRANDE - PB

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

M488d Medeiros, Luanna Abílio Diniz Melquiades de.
Desenvolvimento de esferas de quitosana/*Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants para aplicação como biomaterial / Luanna Abílio Diniz Melquiades de Medeiros. – Campina Grande, 2016.
117 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2016.
"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook".
Referências.

1. Quitosana – Engenharia de Materiais. 2. Esferas de Quitosana. 4. Plantas Medicinais. 5. Regeneração Óssea. I. Fook, Marcus Vinicius Lia. II. Título.

CDU 620.1:677.473(043)

VITAE DO CANDIDATO

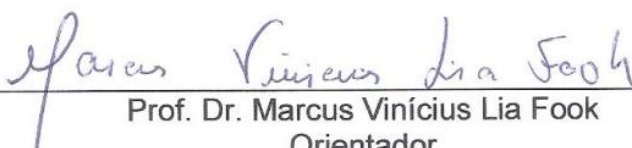
- Graduação em Odontologia - Universidade Federal da Paraíba (2005)
- Especialização em Prótese Dentária - Faculdade Sarandi (2009)
- Mestrado em Odontologia, área de concentração em Clínica Odontológica - Universidade Potiguar (2010).

LUANNA ABÍLIO DINIZ MELQUIADES DE MEDEIROS

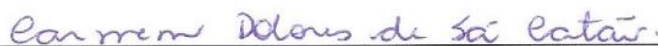
DESENVOLVIMENTO DE ESFERAS DE QUITOSANA/ DYSPHANIA
AMBROSIOIDES (L.) MOSYAKIN & CLEMANTS PARA APLICAÇÃO COMO
BIOMATERIAL

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais como
requisito parcial à obtenção do título
de **Doutor em Ciência e
Engenharia de Materiais.**

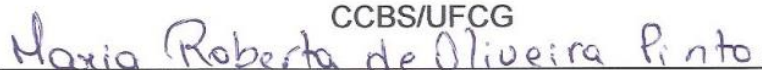
Aprovado em: 24 / 02 / 2016



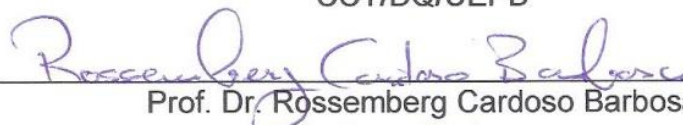
Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook
Orientador
UAEMa/UFCG



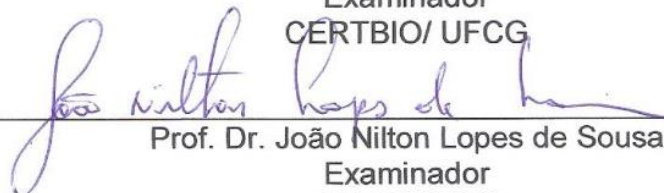
Profª. Drª. Carmem Dolores de Sá Catão
Examinadora
CCBS/UFCG



Profª. Drª. Maria Roberta de Oliveira Pinto
Examinadora
CCT/DQ/UEPB



Prof. Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa
Examinador
CERTBIO/ UFCG



Prof. Dr. João Nilton Lopes de Sousa
Examinador
CSTR/UFCG

Dedico este trabalho aos meus pais, Bosco e Lúcia; ao meu esposo, João Bosco Júnior; às minhas irmãs, Lucíola e Layse Júlia e aos meus sobrinhos; Matheus, Lucas, Arthur, Júlia e João Victor e aos meus cunhados Jânio e Walber.

“Deus está aqui neste momento, sua presença é real em meu viver”

AGRADECIMENTOS

À Deus

Por ter me feito nascer e crescer em uma família cheia de amor e compreensão, por me cercar de pessoas boas e me guiar por caminhos onde eu pudesse encontrar as oportunidades que tenho tido de ser uma pessoa melhor.

À Painho e Mainha

Primeiramente pelo exemplo; mas também pelos ensinamentos, colo, carinho e amor, como também pelas orações. Por terem muitas vezes renunciado seus sonhos para eu pudesse realizar os meus.

Ao meu esposo João Bosco Júnior

Por me compreender e por me incentivar, por ter torcido e comemorado comigo cada etapa vencida. Pelo amor de todos os dias.

Às Minhas Irmãs Lucíola e Layse Julia

Por nossa união, por serem as melhores e mais compreensivas amigas. Pelo amor incondicional, pelos beijos e abraços carinhosos e pela toda torcida de cada dia.

Aos meus sobrinhos: Matheus, Lucas, João Victor e Arthur

Que só alegria trazem à minha vida. Por despertar em mim o desejo de ser cada dia uma pessoa melhor e mais leve.

Aos meus cunhados: Jânio e Walber

Por serem grandes incentivadores e torcedores pelo bem da minha vida, tanto profissional quanto pessoal.

Aos demais familiares

Pela torcida, apoio e compreensão.

À UFCG

Por conceder afastamento das atividades docentes nos últimos meses de curso do doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Por ter acreditado em mim, e apesar de todas as dificuldades que tive no desenvolvimento da pesquisa, nunca deixou que eu desanimasse. Pelo zelo e cuidado sempre dispensados. Pelo forte e motivante aperto de mão e pelo sincero e confortante “olho no olho”, pelo exemplo de trabalho e determinação. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Carlos José de Araújo

Por ter aceitado me orientar no início do doutorado, por ter sido sempre correto e comprometido. Pelo exemplo de organização e competência.

À Prof. Msc. Rosana Araújo Rosendo

No curso do doutorado ganhei também uma irmã, já éramos amigas e já tínhamos muitas semelhanças e afinidades, mas a convivência por dias inteiros a partir, muitas vezes, das 5:00 da manhã; dividindo alegrias e tristezas, dúvidas e certezas; me fizeram admirá-la ainda mais pessoal e profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Rosemberg Cardoso Barbosa

Palavras me faltam para expressar a sua contribuição no meu trabalho. Além de sua competência, você tem uma das qualidades que mais admiro no ser humano, que é a humildade. Mesmo com todo seu conhecimento, nunca se colocou como superior. O seu “vai dá certo, Luanna”, sempre foi um conforto para mim.

À Dayana Kelly Marques de Oliveira

Você foi um anjo que primeiramente Deus e depois Prof. Marcus colocou em minha vida. Por sua ajuda fundamental e seu interesse em sempre ajudar, minha eterna gratidão. Tenho certeza que você terá um futuro brilhante.

Ao Prof. Dr. Jackson Borba Cruz

Pela determinação, pela humildade, o senhor é um exemplo para mim. Pelo carinho e pela valiosa e sempre disponível colaboração.

À Prof. Dra. Carmem Dolores de Sá Catão

Pelo incentivo e disponibilidade, pela amizade e exemplo. “Carmencita”, se não fosse você provavelmente eu não estaria aqui.

Ao Prof. Dr. Euzeli Cipriano dos Santos Júnior

Por ter me incentivado a cursar esse doutorado e por ter aberto as portas da UFCG para que eu pudesse conhecer também o Prof. Dr. Carlos Araújo.

Ao Agrônomo da UFPB Prof. Fernando Antônio Cavalcanti Viana

Por ter sido tão solícito e disponível, abrindo as portas do IPFarM para que eu pudesse obter o extrato de *Dysphania Ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. Sem você não teria conseguido trabalhar com a espécie vegetal que eu tanto queria.

Ao técnico de laboratório da UFCG Sr. Raimundo Nonato

Por ter feito o extrato do *Dysphania Ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, com tanta presteza e disponibilidade.

À Prof. Dra. Maria de Fátima Araújo Lucena e discente Emanuel Messias Pereira do Herbário do CSTR pela presteza e ajuda na identificação botânica.

Aos Professores Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, especialmente àqueles que tive a oportunidade de ter como mestre em alguma disciplina: **Prof. Dra. Laura, Prof. Dr. Walman, Prof. Dra. Crislene, Prof. Dr. Héber, Prof. Dr. Marcus Vinícius.**

Ao Prof. Dr. Romualdo Menezes coordenador do programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, pelo apoio.

Ao professor Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti,

Pela contribuição dispensada na execução das análises estatísticas desse trabalho.

À Sr. Sérgio

Meu conterrâneo, pela disponibilidade, cordialidade e por tanto facilitar minha caminhada no CERTBIO.

À Paulinha

Pelo cuidado e atenção, pela disponibilidade e por tornar melhor meus momentos no CERTBIO.

Aos membros do CERTBIO, especialmente àqueles com quem convivi mais de perto e muito bem me recebem no CERTBIO Josy, Rosita, Tânia, André, Pedro, Dailma, Lívia, Toninho, D. Val, Zélia e Suyana.

Aos colegas do CERTBIO, especialmente: Hudson Araújo Milena, Flávia, Rodrigo, Claydson, Wladimir, Imaraly, Ítalo, Willams, Eunice Paloma por terem disponibilizado seu tempo e compartilhado seu conhecimento para que hoje eu pudesse está aqui. Meu muito obrigada.

Aos professores que fizeram parte das bancas em que estive como candidata: **Prof. Dr. Walman, Prof. Dr. Carlos José, Prof. Dra. Waldênia, Prof. Dr. Bartolomeu, Prof. Dra. Carmem Dolores, Prof. Dr. Marcus Vinícius e Prof. Dra. Verônica Evangelista; Prof. Rossemberg Cardoso, Prof. Dr. João Nilton de Sousa, Prof. Dra. Maria Roberta Pinto**, pela disponibilidade e por terem agregado conhecimento ao meu trabalho.

Aos meus colegas de doutorado Eliéber Barros, Tiago Tibério e Márcio José Cardoso

Que muito me auxiliaram nas disciplinas.

À Márcia e André

Pela presteza e disponibilidade na secretaria da Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

Ao amigo Osmário Medeiros

Amigo de mais de 20 anos, que por algumas vezes durante o curso do doutorado me acolheu em sua casa e por sempre demonstrar o valor da nossa amizade. Por toda a atenção dispensada.

Às colegas e amigas Prof. Dra. Gymenna, e Prof. Msc. Elizandra da UFCG/Campus Patos

Por me incentivarem e não medirem esforços para que eu pudesse conciliar minhas atividades docentes em Patos com minhas atividades discentes em Campina Grande. Muitas vezes ficando responsáveis por minhas atribuições na Clínica.

Aos Colegas das Faculdades Integradas de Patos (FIP): Prof. Msc. Vinícius Santa Cruz e Prof. Msc. Thiago Serpa

Por, no início do doutorado, algumas vezes terem se sobrecarregado de trabalho na clínica para que eu pudesse está em alguma atividade do doutorado.

À Professora Dra. Fátima Roneiva

Na época em que ingressei no doutorado por ter ajustado meus horários nas FIP, para que eu pudesse conciliar o trabalho e estudo. E também por incentivar essa minha busca por conhecimento.

À Professora Dra. Waldênia Freire

Por ter sido uma grande incentivadora e também um exemplo de determinação e competência.

À Bruno Montenegro

Por ter sido mais que um taxista, por ter se tornado um amigo, que nos conduziu por infinitos quilômetros sempre com responsabilidade, para que pudéssemos ir e voltar bem de Patos a Campina e vice-versa. Quando sabia que o motorista seria você, conseguia dormir na véspera da viagem antes das 2h da manhã.

À Prof. Débora Medcraft

Por ser sempre disponível e ter sido responsável pela correção do abstract.

À Johnantan Candeia

Pelo profissionalismo na revisão da formação do texto.

RESUMO

Diversos biomateriais tem sido desenvolvidos para preencher ou reconstruir defeitos ósseos, dentre esses destaca-se a quitosana por seu potencial osteoindutor. Outras substâncias que tem despertado o interesse da comunidade científica são os fitoterápicos, nesse grupo encontra-se o mastruz (*Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants), por apresentar capacidade de estimular e acelerar o reparo ósseo. Sendo assim, este trabalho objetivou desenvolver e avaliar esferas de quitosana/ *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants para aplicação como biomaterial para regeneração óssea. Para tanto foi feita a coleta e identificação botânica da espécie vegetal, em seguida foi produzido o extrato alcoólico bruto (EAB) do qual foi realizada a caracterização fitoquímica. Feito isso, foram confeccionadas esferas, pela técnica de geleificação ionotrópica, utilizando o Tripolifosfato de sódio (TPP) como agente de reticulação e em seguida as mesmas foram lavadas com água destilada e colocadas para secagem na estufa. Após esse processo, as esferas de quitosana e quitosana com diferentes concentrações do EAB foram caracterizadas utilizando Microscopia Ótica (MO); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR); Medida do diâmetro das mesmas; ensaios de Citotoxicidade *in vitro*, Biodegradação enzimática *in vitro* e Compressão. O resultado da caracterização fitoquímica, demonstrou a presença de esteróides, saponinas e principalmente flavonóides no extrato alcóolico bruto (EAB). A MO evidenciou a formação de esferas bem delimitadas e com tendência a ficarem mais escuras a medida em que se aumentava a concentração do EAB; a MEV revelou a presença de uma superfície externa enrugada e uma superfície interna com aspecto denso devido ao processo de secagem na estufa. O estudo químico realizado através do FTIR identificou todas as bandas características típicas de cada material estudado nesta pesquisa; e nas esferas produzidas, verificou-se a interação do TPP com a quitosana. A medida do diâmetro das esferas de quitosana sem incorporação EAB (Q0) foi menor em comparação aos demais grupos: quitosana+5% de EAB (Q5), quitosana+10% de EAB (Q10) e quitosana+20% de EAB (Q20). Todas as amostras foram consideradas não citotóxicas; com relação à biodegradação, na presença de lisozima, as esferas de todos os grupos apresentaram perda de massa em todos os tempos estudados, já na solução Phosphate Buffered Saline (PBS) foi observado um ganho de massa em todos os grupos nos diversos tempos estudados. O grupo Q0 suportou maior carga compressiva e também deformou mais, antes de fraturar, quando comparado aos grupos Q5, Q10 e Q20. Desta forma pode-se concluir que a metodologia para produção de esferas foi de fácil execução, sendo por tanto reprodutível e que por meio das caracterizações realizadas observou-se que o EAB, tornou as esferas maiores, atuou como agente reticulante da quitosana, aumentando o tempo de degradação e também a carga compressiva suportada e deformação sofrida até a fratura. Dessa forma a incorporação do EAB foi favorável para utilização das esferas como possível agente osteoindutor, visto que os produtos da sua degradação podem atuar com esse propósito, sendo as esferas do grupo Q20 as mais indicadas para áreas com dimensões anatômicas reduzidas.

Palavras-chave: Quitosana. Esferas. Plantas medicinais. Regeneração óssea.

ABSTRACT

Several biomaterials have been developed to fill in or reconstruct bone defects, among these the chitosan stands out due to its osteoinductive potential. Other substances have aroused the interest of the scientific community are the phytotherapies, in this group can be found the 'mastruz' (*Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants), for presenting the capacity of stimulating and accelerate bone repair. Thereby, this work aimed to develop and assess chitosan *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants spheres for application as a biomaterial for bone regeneration. For this purpose the collection and botanical identification was carried out, and after the crude ethanolic extract (CEE) was produced, and its phytochemical characterization was performed. Having done this, spheres were made, by the ionotropic gelation method, using the Sodium tripolyphosphate (TPP) as a cross-linking agent and after, they were washed with distilled water and placed to dry in the oven. After this process, the chitosan spheres and chitosan with different concentrations of the EAB were characterized using Optical Microscopy (OM); Scanning Electron Microscopy (SEM); Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR); measurement of the diameter; *in vitro* Cytotoxicity, *in vitro* Enzymatic biodegradation and Compression tests. The result of the phytochemical characterization, demonstrated the presence of steroids, saponins and mainly flavonoids, in the crude ethanolic extract (CEE). The OM revealed the formation of well delimited spheres with a tendency of becoming darker as the EAB concentration increased; the SEM revealed the presence of a wrinkled external surface and an internal surface with a dense aspect due to the drying in the oven process. The chemical study performed by the FTIR identified all the bands typical characteristics of each material studied in this research; and in the produced spheres, the interaction of the TTP with the chitosan was found. The measures of the chitosan sphere's diameters without the incorporation of the CEE (Q0) were smaller in comparison to the other groups: chitosan+5% of CEE (Q5), chitosan+10% of CEE (Q10) and chitosan+20% of CEE (Q20). All the samples were considered not cytotoxic; in relation to the biodegradation, in the presence of lysozyme, the spheres of all the groups presented mass loss at all the studied times, as for in the solution Phosphate Buffered Saline (PBS) a mass gain was observed in all the groups at the various studied moments. The Q0 group bared a greater compressive load and also deformed more, before fracturing, when compared to the Q5, Q10 and Q20 groups. This way it can be concluded that the methodology for the production of spheres was easy to carry out, therefore being reproducible and by means of the characterizations performed it was observed that CEE, made the spheres bigger, acted as a cross-linking agent of the chitosan, increasing the degradation time and also the supported compressive load and deformation suffered until the fracture. This way the incorporation of the CEE was favorable for the use of the spheres as a possible osteoinductor agent, seen as the products of their degradation may act with this purpose, being the spheres of the Q20 group the most indicated for areas with reduced anatomic dimensions.

Keywords: Chitosan. Spheres. Medicinal plants. Bone regeneration.

PUBLICAÇÕES

Apresentação do trabalho: Sistema de liberação controlada: desenvolvimento e caracterização de estruturas de quitosana/ *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E. Jarvis”, apresentado no **4º OBI – 4ª Edição de Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais**, realizado de 19 a 22 de Agosto de 2015, em Campina Grande-PB.

Artigo intitulado: Esferas de quitosana/D. ambrosioides (mastruz) como biomaterial osteoindutor, submetido à **Revista Brasileira de Odontologia** em 22.02.2016.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Corte de um osso humano seco, evidenciando o osso compacto e o osso esponjoso (Junqueira e Carneiro, 2013)..... | 23 |
| Figura 2 – Arranjo da hidroxiapatita carbonatada e colágeno na composição do osso (Adaptada de Vallet-Regí e González-Calbet, 2004)..... | 25 |
| Figura 3 – Esquema de formação da matriz óssea (Junqueira e Carneiro, 2013)..... | 26 |
| Figura 4 – Representação do processo de obtenção da quitosana por meio da desacetilação da quitina (Azevedo <i>et al.</i> , 2007)..... | 35 |
| Figura 5 – (A) Esfera: o agente está distribuído em uma matriz polimérica; e (B) Cápsula: o agente ativo está envolvido pelo agente polímero (Suave <i>et al.</i> , 2006)..... | 39 |
| Figura 6 – Representação das interações formadas entre a quitosana e o Tripolifosfato de Sódio - TPP ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) (Kašpar <i>et al.</i> , 2013)..... | 40 |
| Figura 7 – Estrutura química do ascaridol, composto presente extrato de mastruz. (Parra <i>et al.</i> , 2000)..... | 44 |
| Figura 8 – Fluxograma das etapas da metodologia empregada na pesquisa (Autor, 2016)..... | 49 |
| Figura 9 – Espécie vegetal no Horto de Plantas Medicinais do IPeFarmM (Autor, 2016)..... | 50 |
| Figura 10 – Prensa utilizada (A) e imagem espécie vegetal após processo de secagem na estufa artesanal (B) (Autor, 2016)..... | 50 |
| Figura 11 – Exsicata depositada no Herbário CSTR (Autor, 2016)..... | 51 |
| Figura 12 – Espécie vegetal cortada para pesagem (Autor, 2016)..... | 52 |
| Figura 13 – Percolador de aço inox (Autor, 2016)..... | 52 |
| Figura 14 – Adição do etanol 95% (A) e o vegetal com etanol deixados em repouso (B) (Autor, 2016)..... | 53 |
| Figura 15 – Algodão colocado dentro do percolador para filtragem (A) e Balão volumétrico com líquido verde resultante (B) (Autor, 2016)..... | 53 |
| Figura 16 – Rota evaporador rotatório utilizado (Autor, 2016)..... | 54 |
| Figura 17 – Recipiente contendo o extrato (A) e imagem superior do recipiente contendo o extrato (B) (Autor, 2016)..... | 54 |
| Figura 18 – Preparo da solução de quitosana 2% em ácido acético glacial a 1% sob agitação mecânica (Autor, 2016)..... | 55 |

| | |
|--|----|
| Figura 19 – Dissolução do extrato do mastruz. (A) Pesagem do EAB, (B) Incorporação do EAB na solução de quitosana e (C) Mistura do EAB na solução de quitosana sob agitação mecânica (Autor, 2016)..... | 56 |
| Figura 20 – Conjunto (seringa/agulha/solução) acoplado a bomba de infusão (A) e Formação da gotícula (B) (Autor, 2016)..... | 58 |
| Figura 21 – Formação das esferas (A) e Esferas em repouso na solução de TPP 5% (B) (Autor, 2016)..... | 58 |
| Figura 22 – Lavagem das esferas com água (A) e Esferas na peneira (B) (Autor, 2016)..... | 58 |
| Figura 23 – Esferas de quitosana/ <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants na estufa, dispostas em discos de papel filtro (A) e os mesmos na estufa (B) (Autor, 2016)..... | 59 |
| Figura 24 – Amostras acondicionadas por grupo em tubos falcon (A) e amostras organizadas em eppendorf e identificadas (B) (Autor, 2016)..... | 59 |
| Figura 25 – Fluxograma com as caracterizações realizadas (Autor, 2016)..... | 61 |
| Figura 26 – Corte da esfera com uma lâmina de bisturi (Autor, 2016)..... | 62 |
| Figura 27 – Processo de trituração das esferas para o FTIR. Esferas inteiras (A), Trituração das mesmas com odontoscópio (B) e aspecto final das esferas após trituração (Autor, 2016)..... | 63 |
| Figura 28 – Ponteira do FTIR espalhando as esferas inteiras. Esferas inteiras (A), Trituração das mesmas com odontoscópio (B) e aspecto final das esferas após trituração (Autor, 2016)..... | 63 |
| Figura 29 – Imagens das esferas no MO com aumento de 40X. (Q0) Esferas de quitosana, (Q5) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10) Esferas quitosana +10% EAB e (Q20) Esferas quitosana +20% EAB (Autor, 2016)..... | 69 |
| Figura 30 – Imagens das esferas no MO com aumento de 100X. (Q0) Esferas de quitosana, (Q5) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10) Esferas quitosana +10% EAB e (Q20) Esferas quitosana +20% EAB (Autor, 2016)..... | 70 |
| Figura 31 – Imagens da superfície interna no MO com aumento de 160X. (Q0) Esferas de quitosana, (Q5) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10) Esferas quitosana +10% EAB e (Q20) Esferas quitosana +20% EAB (Autor, 2016)..... | 71 |
| Figura 32 – Imagens do MEV com aumento de 1000X. (Q0) Esferas de quitosana, (Q5) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10) Esferas quitosana +10% EAB e (Q20) Esferas quitosana +20% EAB (Autor, 2016)..... | 72 |
| Figura 33 – Imagens do MEV com aumento de 180X. (Q0) Esferas de quitosana, (Q5) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10) Esferas quitosana +10% EAB e (Q20) Esferas quitosana +20% EAB (Autor, 2016) | 74 |

| | |
|---|----|
| Figura 34 – Imagens do MEV com aumento de 2000X. (Q0A) Esferas de quitosana, (Q5A) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10A) Esferas quitosana +10% EAB e (Q20A) Esferas quitosana +20% EAB, todas lavadas com água (Autor, 2016)..... | 75 |
| Figura 35 – Imagens do MEV com aumento de 2000X. (Q0) Esferas de quitosana, (Q5) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10) Esferas quitosana +10% EAB e (Q20) Esferas quitosana +20% EAB (Autor, 2016)..... | 76 |
| Figura 36 – Espectro na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier da quitosana em pó utilizada (Autor, 2016)..... | 78 |
| Figura 37 – Espectro na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do extrato alcoólico bruto de <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants tripolifosfato (EAB) (Autor, 2016)..... | 78 |
| Figura 38 – Espectro na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do TPP (Autor, 2015)..... | 79 |
| Figura 39 – Espectro na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier das esferas dos grupos Q0, Q5, Q10 e Q20 (Autor, 2016)..... | 81 |
| Figura 40 – Diâmetro das esferas de quitosana incorporadas com diferentes concentrações do extrato de <i>Dysphania ambrosioides</i> L. (mastruz), antes e após o processo de desidratação. Barras indicam média (μm) e \pm desvio-padrão (Autor, 2016)..... | 82 |
| Figura 41 – Biodegradação das esferas de quitosana incorporadas com diferentes concentrações do extrato de <i>Dysphania ambrosioides</i> L. (mastruz), em diferentes tempos de análise (7Di- inicial de 7 dias; 7Df- final de 7 dias; 14Di- inicial de 14 dias; 14Df- final de 14 dias; 21Di- inicial de 21 dias e 21Df- final de 21 dias) na presença de lisozima. Barras indicam média (mg) e \pm desvio-padrão (Autor, 2016)..... | 85 |
| Figura 42 – Biodegradação das esferas de quitosana incorporadas com diferentes concentrações do extrato de <i>Dysphania ambrosioides</i> L. (mastruz), em diferentes tempos de análise (7Di- inicial de 7 dias; 7Df- final de 7 dias; 14Di- inicial de 14 dias; 14Df- final de 14 dias; 21Di- inicial de 21 dias e 21Df- final de 21 dias), na ausência de lisozima. Barras indicam média (mg) e \pm desvio-padrão (Autor, 2016)..... | 87 |
| Figura 43 – Máxima carga compressiva (em N) das esferas de quitosana incorporadas com diferentes concentrações do extrato de <i>Dysphania ambrosioides</i> L. (mastruz). Barras indicam média (N) e \pm desvio-padrão (Autor, 2016)..... | 88 |
| Figura 44 – Deformação compressiva em máxima carga compressiva (%) das esferas de quitosana incorporadas com diferentes concentrações do extrato de <i>Dysphania ambrosioides</i> L. (mastruz). Barras indicam media (%) e \pm desvio-padrão (Autor, 2016)..... | 89 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Tipos de apresentação e métodos de preparação da quitosana para liberação de fármacos..... | 38 |
| Tabela 2 – Identificação dos grupos formados..... | 60 |
| Tabela 3 – Médias e desvio padrão das esferas úmidas e secas de cada grupo..... | 83 |
| Tabela 4 – Percentual de viabilidade celular de cada grupo..... | 83 |
| Tabela 5 – Quantidade de artigos aproveitados e atividades citadas nas bases de dados..... | 91 |
| Tabela 6 – Quantidade de documentos e atividades citadas nas bases de dados..... | 91 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

APG – Grupo para a Filogenia das Angiospermas

ASTM – American Society for Testing and Materials

BMP – Proteínas morfogenéticas ósseas

BSA – Albumina de soro bovino

BSP – Sialoproteína óssea

CERTBIO – Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste

CIP – Classificação Internacional de Patentes

CSTR – Centro de Saúde e Tecnologia Rural

DBM – Matriz óssea de origem bovina

EAB – Extrato alcoólico bruto

EBH – Extrato bruto hidroalcoólico

EGDE – Etileno glicol éter diglicídico

EPO – European Patent Office

FTIR – Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

GA – Grau médio de acetilação

GlcN – 2-amino-2-desoxi-D-glicopironase

GlcNAc – 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopironase

INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial

IPeFarmM – Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

ISO – International Standard Organization

LPS – Lipopolissacarídeos

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MO – Microscopia Ótica

MTT – Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

NH₂ – Grupo amino

NHCOCH₃ – Grupo acetamida

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS - Phosphate Buffered Saline

pH – Potencial hidrogeniônico

PMNs – Polimorfonucleares

Q0 – Esferas de quitosana

Q10 – Esferas de quitosana + 10% do EAB

Q20 – Esferas de quitosana + 20% do EAB

Q5 – Esferas de quitosana + 5% do EAB

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SUS – Sistema Único de Saúde

TPP – Tripolifosfato de Sódio

UFCG – Universidade Federal de Campina Grande

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

USPTO – United States Patent and Trademark Office

WIPO – World Intellectual Property Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

% – por cento

nm – nanômetros

β – Beta

> – maior que

\leq – menor ou igual a

m – metro

cm – centímetro

mm – milímetro

α – alfa

mg/Kg – miligrama por quilograma

® – marca registrada

g – grama

mg – miligrama

°C – Grau Celsius

m/v – massa por volume

v/v – volume por volume

rpm – rotações por minuto

mL – mililitro

mL/h – mililitro por hora

X – Vezes

KV– Quilovolt

μ L – microlitros

mg/mL – miligrama/ mililitro

< – menor que

\pm – mais ou menos

mm/min – milímetro por minuto

N – Newton

v – Volume

μ m - micrômetro

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 21 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 23 |
| 2.1 Tecido Ósseo..... | 23 |
| 2.2 Regeneração Óssea | 26 |
| 2.3 Enxertos Ósseos..... | 30 |
| 2.4 Biomateriais | 32 |
| 2.5 Quitosana | 34 |
| 2.6 Esferas de quitosana | 38 |
| 2.7 Plantas Medicinais | 41 |
| 2.8 <i>Dysphania ambrosioides</i> L. Mosyakin & Clemants - Mastruz | 43 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 48 |
| 3.1 Materiais | 48 |
| 3.2 Metodologia | 48 |
| 3.2.1 Tipo e local da pesquisa..... | 48 |
| 3.2.2 Coleta da Planta e Identificação Botânica..... | 50 |
| 3.2.3 Obtenção do Extrato Vegetal | 51 |
| 3.2.4 Procedimento Fitoquímico: <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants..... | 54 |
| 3.2.5 Preparação das esferas de quitosana/ <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants e esferas de quitosana (grupo controle) | 55 |
| 3.2.5.1 Preparação das esferas de quitosana/ <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants | 55 |
| 3.2.5.2 Preparação das esferas de Quitosana..... | 60 |
| 3.2.6 Técnicas de caracterização..... | 60 |
| 3.2.6.1 Microscopia Óptica (MO) | 61 |
| 3.2.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 62 |
| 3.2.6.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) | 63 |
| 3.2.6.4 Medida do diâmetro das esferas..... | 64 |
| 3.2.6.5 Ensaios de citotoxicidade <i>in vitro</i> | 64 |
| 3.2.6.6 Ensaio de Biodegradação Enzimática <i>in vitro</i> | 65 |
| 3.2.6.7 Ensaio de Compressão..... | 66 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.7 Análise estatística | 67 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 68 |
| 4.1 Procedimento Fitoquímico: <i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants | 68 |
| 4.2 Técnicas de caracterização..... | 68 |
| 4.2.1 Microscopia Óptica (MO) | 69 |
| 4.2.1.1 Superfície externa..... | 69 |
| 4.2.1.2 Superfície interna..... | 71 |
| 4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 72 |
| 4.2.2.1 Superfície externa..... | 72 |
| 4.2.2.2 Superfície interna..... | 73 |
| 4.2.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)..... | 77 |
| 4.2.4 Medida do diâmetro das esferas | 81 |
| 4.2.5 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> | 83 |
| 4.2.6 Ensaio de Biodegradação Enzimática <i>in vitro</i> | 84 |
| 4.2.7 Ensaio de compressão..... | 88 |
| 4.3 Aplicações do mastruz baseadas em evidências..... | 89 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 93 |
| 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 94 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 95 |
| APÊNDICE A..... | 113 |
| APÊNDICE B..... | 114 |
| APÊNDICE C | 115 |
| APÊNDICE D | 116 |

1 INTRODUÇÃO

Os biomateriais têm sido amplamente aplicados na área clínica como meio de substituição e/ou reparo de tecidos biológicos, tais como enxertos, implantes ortopédicos e dentários, próteses, placas e parafusos ortopédicos, válvulas cardíacas, lentes de contato, entre outros (Cordas, 2006).

Sabendo-se que a maior parte das lesões ósseas tratadas anualmente, em todo o mundo, requerem o emprego de técnicas de enxertia (Einhorn, 1999), tem-se realizado pesquisas em busca de materiais naturais ou sintéticos que possam substituir o tecido ósseo (Norton e Wilson, 2002).

Para a recuperação de elementos dentários perdidos, tem-se disponível a técnica que utiliza os implantes dentários osseointegráveis, porém em alguns casos, é indispensável a utilização de técnicas cirúrgicas de enxertos para repor o tecido ósseo perdido, ou para prevenir que ocorram essas perdas. Há situações clínicas em que se torna necessário o preenchimento do alvéolo dentário imediatamente após a exodontia e previamente à instalação do implante osseointegrável, tornando possível sua osseointegração (Boëck-Neto *et al.*, 2009).

Apesar do enxerto autógeno ser o padrão ouro de enxertia, este apresenta limitações como a quantidade de tecido ósseo no sítio doador (Taga, 1996), a elevada morbidade inerente ao procedimento, eventual necessidade de uma nova etapa cirúrgica, risco de infecção e a própria absorção do tecido transplantado (Khan, Tomin e Lane, 2000). Por essas razões, os enxertos homogêneos e heterogêneos, e os substitutos ósseos sintéticos têm sido amplamente estudados como uma alternativa aos enxertos autógenos, devido à facilidade de obtenção em grande quantidade e à sua boa integração com o leito receptor, e são, portanto, considerados como materiais aceitáveis para tal finalidade (Davies, 2003; Bourguignon Filho, 2005).

Diversos biomateriais tem sido desenvolvidos para preencher ou reconstruir defeitos ósseos, tais como coral natural, osso desmineralizado poroso de origem bovina, matriz óssea de origem humana (DBM), as biocerâmicas e os biopolímeros (Daculsi, 2004). Dentre esses destaca-se a quitosana, esse biopolímero foi estudado por diversos pesquisadores que avaliaram o processo de regeneração óssea e concluíram que a quitosana acelerou e maximizou o reparo ósseo, apresentando

grande potencial osteogênico, atuando como um biomaterial osteoindutor (Ge *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2013).

A quitosana é um polissacarídeo natural, derivado da desacetilação da quitina, encontrada principalmente em carapaças de crustáceos (Santos *et al.*, 2006).

Outras substâncias que tem despertado o interesse da comunidade científica são os fitoterápicos (Lapa *et al.*, 2007), quando utilizados juntamente com biomateriais osteoindutores, aceleram o processo de formação do tecido ósseo agindo como um agente potencializador. As principais razões que impulsionam o crescimento do uso dos fitoterápicos são a valorização de hábitos de vida saudáveis e comprovação científica da ação de espécies vegetais (Sousa e Miranda, 2003).

Dentre as plantas medicinais estudadas, o mastruz (*Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants) apresenta propriedades que despertam o interesse na área médica-odontológica; como a capacidade de acelerar o reparo ósseo (Penha, 2012); bem como o efeito anti-inflamatório e cicatrizante nos tecidos pulpar e periodontal, diminuindo a intensidade de polimorfonucleares, o abscesso, necrose e estimulando o reparo ósseo alveolar (Sousa, 2010).

Sendo assim este trabalho objetivou desenvolver e avaliar esferas de quitosana/ *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants para aplicação como biomaterial, com ênfase na regeneração óssea.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto humano, o qual serve de suporte para os tecidos moles e protege os órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal raquidiano. O mesmo ainda abriga a medula óssea, formadora das células do sangue (Junqueira e Carneiro, 2013).

O osso é também responsável pela direção e a extensão dos movimentos do corpo e atua como um ponto de ancoragem para a maior parte dos músculos e ligamentos. Quando os músculos se contraem, os ossos longos agem como alavancas, e as articulações funcionam como eixos, dando origem aos movimentos do corpo (Park *et al.*, 2006). O osso possui ainda a função de ser um reservatório de cálcio, visto que 99% deste mineral encontrado em todo organismo, está presente no tecido ósseo (Moraes Júnior, 2002).

Do ponto de vista histológico, o tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, innervado e vascularizado, constituído por células e uma matriz extracelular calcificada. Está estruturado em lâminas e a disposição destas lâminas é que determina se o osso é compacto (cortical) ou esponjoso (Moraes Júnior, 2002) como pode ser observado na Figura 1.

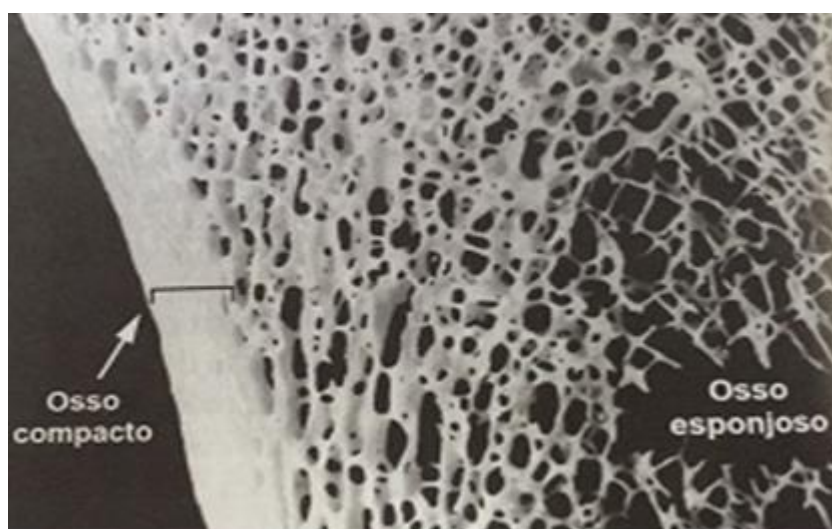


Figura 1 – Corte de um osso humano seco, evidenciando o osso compacto e o osso esponjoso (Junqueira e Carneiro, 2013).

O osso cortical ou compacto se estrutura em condutos de Havers recobertos por lâminas em disposição concêntrica onde estão situados os osteócitos e é caracterizado por pouca atividade metabólica e poucas células. Já o osso esponjoso ou trabecular é constituído por lâminas ósseas em forma de rede que delimita cavidades areolares em cujo interior se encontra a medula óssea, tendo a função de receber cargas e responder rapidamente às necessidades fisiológicas (Moraes Júnior, 2002).

A matriz extracelular é composta por uma fase inorgânica, uma fase orgânica e água. A fase inorgânica ou mineral corresponde a 65% do peso do tecido ósseo, a fase orgânica corresponde a 20% e os outros 15% são de água (Katchburian e Arana, 2014).

A combinação entre a dureza da fase inorgânica e a resistência da fase orgânica são responsáveis pelas propriedades mecânicas do osso. Esta combinação de materiais diferentes com propriedades inteiramente distintas resulta na formação de um nanocompósito com propriedades físicas que superam as dos componentes individuais (Katti, 2004).

A fase inorgânica é formada por um fosfato de cálcio apatítico, denominado hidroxiapatita carbonatada (Sinha *et al.*, 2001), enquanto que a fase orgânica é composta principalmente por colágeno. A matriz orgânica tem dois componentes, o fibrilar que corresponde às fibras colágenas e a substância fundamental interfibrilar. O colágeno encontrado no osso maduro é em sua maior proporção do tipo I, correspondendo a 85% da fase orgânica; o colágeno tipo III e V não correspondem a mais que 5% dessa fase; enquanto que os outros 10% correspondem às chamadas moléculas não colágenas (Katchburian e Arana, 2014).

As moléculas do colágeno são ligadas formando cadeias lineares organizadas em forma de fibras, as quais formam estruturas macroscópicas variadas. Entre as moléculas de colágeno há pequenos espaços vazios, espaçados regularmente, onde os nanocristais de apatita são depositados, em um processo de mineralização controlado envolvendo mais de 200 proteínas ácidas diferentes. Tais proteínas agem como inibidores, nucleadores ou suportes para o crescimento de nanocristais ancorados no colágeno (Vallet-Regí e González-Calbet, 2004). Na literatura pode ser observado tamanho dos cristais ósseos variando de 25 a 50 nm de comprimento, de 15 a 30 nm de largura e de 2 a 10 nm de espessura (Olszta *et al.*, 2007) (Figura 2).

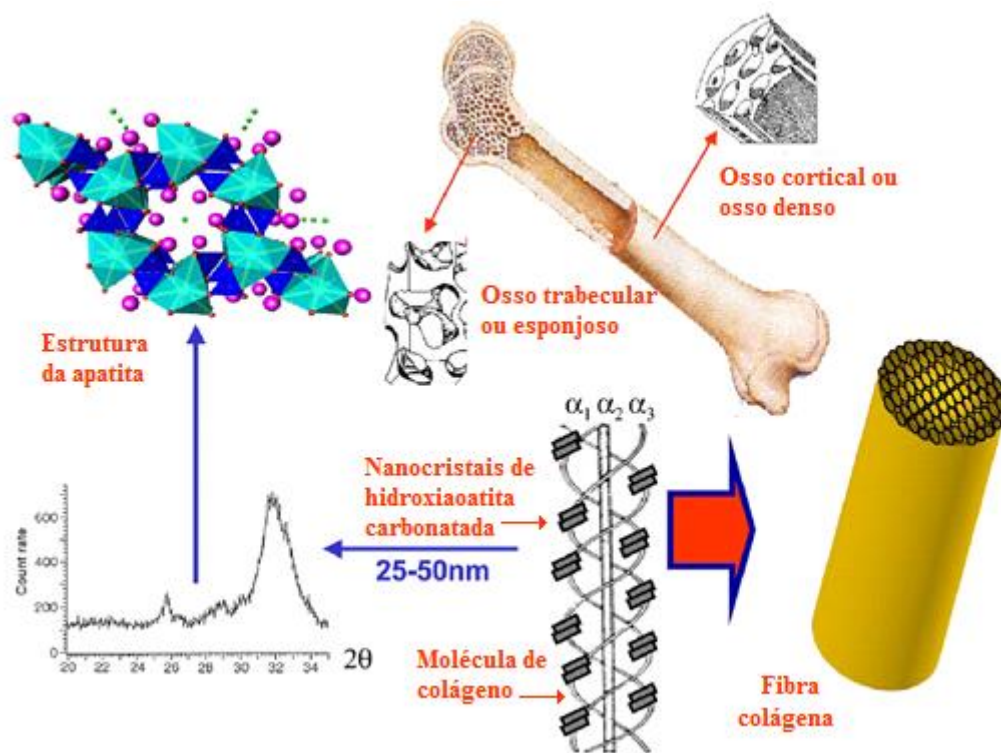


Figura 2 – Arranjo da hidroxiapatita carbonatada e colágeno na composição do osso (Adaptada de Vallet-Regí e González-Calbet, 2004).

Como exemplo das moléculas não colágenas tem-se as fosfoproteínas, Gla-proteínas (osteocalcina), glicoproteínas ácidas (osteonectina), osteopontina, sialoproteína óssea (BSP), proteoglicanos/glicosaminoglicanos, proteínas séricas e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) (Katchburian e Arana, 2014).

Além dessa matriz extracelular calcificada, o tecido ósseo é formado por células que são: os osteócitos, os quais ficam em cavidades no interior da matriz; os osteoblastos, responsáveis por sintetizar a parte orgânica da matriz e que se encontram localizados na periferia da mesma e finalmente os osteoclastos, células gigantes e móveis cuja função é reabsorver o tecido ósseo, sendo fundamental no processo de remodelação óssea (Junqueira e Carneiro, 2013).

O tecido ósseo se modifica ao longo da vida do indivíduo e possui uma capacidade peculiar de remodelação e reparação sem a presença de cicatrizes, porém em algumas situações devido à extensão do defeito causado, o tecido ósseo não se regenera por completo (Ludwig, Kowalski e Boden, 2000).

2.2 Regeneração Óssea

A formação óssea ocorre como consequência de uma cascata de eventos, a qual se inicia com o recrutamento e proliferação de células osteoprogenitoras seguida por sua diferenciação celular, formação da matriz osteóide e mineralização (Aubin e Liu, 1996). Esses eventos ocorrem pelo fato do tecido ósseo ser um tipo especializado de tecido conjuntivo, formado por células; tais como osteócitos, osteoblastos, e osteoclastos, além de uma matriz óssea (Figura 3) cuja matriz inorgânica é representada principalmente por íons de cálcio e fosfato os quais formam cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Junqueira e Carneiro, 2013).

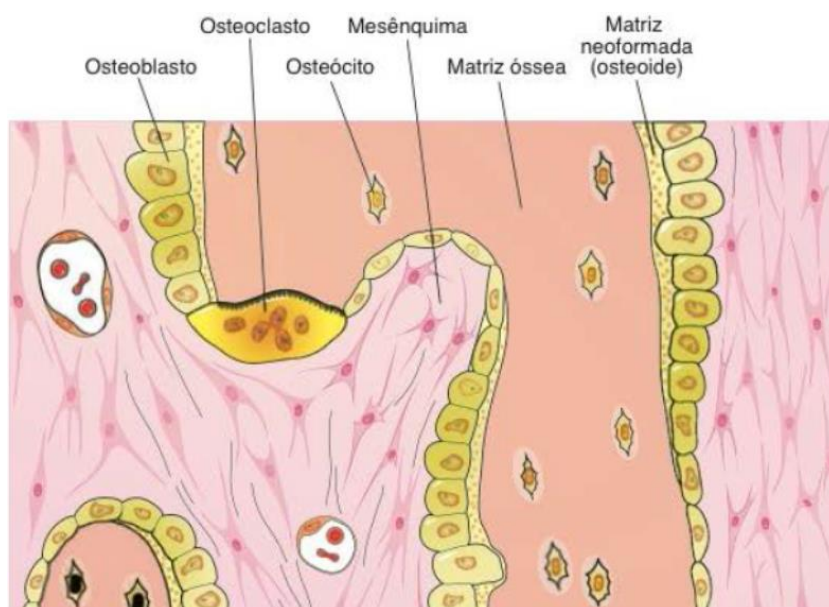


Figura 3 – Esquema de formação da matriz óssea (Junqueira e Carneiro, 2013).

Assim sendo, o tecido ósseo apresenta resistência às pressões e dureza, atribuídas à presença da hidroxiapatita e ao mesmo tempo plasticidade conferida pelas fibras colágenas do tipo I. Por essas características, o mesmo remodela-se de forma contínua, de acordo com as demandas funcionais a que está submetido (Junqueira e Carneiro, 2013). Porém, esse potencial regenerativo é limitado. Em situações clínicas pouco favoráveis à reabilitação estrutural e funcional do tecido como por exemplo, em áreas de extenso comprometimento vascular e/ou perda ou ausência excessiva de substância óssea, o reparo da lesão no tecido ósseo pode resultar na formação de tecido conjuntivo fibroso ou cicatricial, na maior parte dos

casos com comprometimento estrutural e/ou funcional da região atingida (Lim, Lee e Yeo, 2000).

Um situação clínica pouco favorável ocorre com frequência no caso da exodontia, isto é a remoção do elemento dentário do alvéolo, a qual resulta em perda de osso alveolar em decorrência da atrofia do rebordo edêntulo (Carvalho e Vasconcellos, 2000), nesse caso ocorre o desencadeamento de um processo fisiológico de reabsorção de forma progressiva e cumulativa, influenciando negativamente nas funções do sistema estomatognático e a estética do paciente e a vida social dos mesmos (Calasans-Maia, Fernandes e Granjeiro, 2008).

Essa perda do osso alveolar pós exodontia, chamada de reabsorção do rebordo residual, ocorre logo após a remoção do dente e continua durante toda a vida do paciente. Esse processo varia de intensidade de indivíduo para indivíduo e é influenciado por fatores como idade, sexo, morfologia facial, forças oclusais, uso de medicamentos, entre outros. Porém não há um fator dominante que possa determinar a severidade da reabsorção, nem mesmo um conhecimento consolidado a respeito de como tais fatores atuam em conjunto ou separados (Cunha e Marchini, 2010).

Essa atrofia pode ser um fator limitante à reabilitação com implantes dentários, pois é necessário um volume ósseo suficiente em largura, espessura e altura para instalação e osseointegração dos implantes dentários, sendo em muitos casos indicado a utilização de enxertos, a fim de viabilizar o tratamento (Jung *et al.*, 2003).

Além das exodontias, outros fatores também podem ocasionar a perda de tecido ósseo na maxila e na mandíbula, dentre os quais se destacam: traumatismos dentoalveolares, ausência dentária congênita, infecções (Toledo Filho, Marzola e Sanches, 2001), doença periodontal, cirurgias traumáticas, ou até mesmo por razões fisiológicas devido à falta de função do rebordo ou carga protética inadequada (Mendes, 2000).

Para a regeneração óssea são necessários quatro requisitos: um sinal morfogenético, células hospedeiras que respondam a esse sinal; um carreador apropriado deste sinal que o possa entregar aos locais específicos e sirva assim como um suporte para o crescimento das células responsivas do hospedeiro e um leito viável e bem vascularizado (Sakata *et al.*, 2004).

Os mecanismos fisiológicos envolvidos no processo de formação de tecido ósseo podem ocorrer de maneiras distintas, a osteogênese, a osteocondução e a osteoindução. Os materiais osteogênicos são aqueles materiais orgânicos capazes de estimular a formação de osso diretamente a partir de osteoblastos. Os materiais osteocondutores (geralmente inorgânicos) permitem a aposição de um novo tecido ósseo na sua superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras. Os osteoindutores são aqueles capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, aumentando a formação óssea no local (Sicca *et al.*, 2000).

As técnicas para regeneração óssea incluem tanto a utilização de enxertos de origem animal ou humana, como de materiais sintéticos (polímeros e cerâmicas principalmente) na forma de cimentos, grânulos ou estruturas tridimensionais (Toro, 2005).

A regeneração óssea após uma lesão ocorre em um tempo relativamente curto e da seguinte forma: a atividade conjunta dos osteoclastos (células de reabsorção) e dos osteoblastos (células de formação) é a responsável pela renovação do tecido ósseo velho ou danificado. Os sinais gerados pela necessidade de cálcio e a necessidade de substituição de tecido ósseo velho, recrutam os precursores dos osteoblastos. Durante o período de aproximadamente um mês, os osteoclastos escavam um ponto de reabsorção criando um ambiente ácido para desmineralizar o osso e liberando enzimas que degradam a matriz orgânica. Os osteoblastos chegam na sequência, produzindo as proteínas da matriz óssea e facilitando a calcificação do osso. Os osteoblastos levam aproximadamente três meses para preencher a cavidade criada pelos osteoclastos. O processo metabólico completo, é chamado de “turnover” ou “remodelagem” óssea (Fisher, 2007).

Para a substituição de elementos dentários perdidos, tem-se disponível a consagrada técnica que utiliza os implantes dentários osseointegráveis, porém em locais com perdas ósseas devido a traumas, doenças periodontais e neoplasias, para manutenção e recuperação da arquitetura alveolar, faz-se necessário lançar mão de técnicas cirúrgicas de enxertos para repor o tecido ósseo perdido, ou para prevenir que ocorram perdas, torna-se necessário o preenchimento do alvéolo dentário imediatamente após a exodontia e previamente à instalação do implante osseointegrável (Boëck-Neto *et al.*, 2009).

Na área médico-odontológica têm sido realizadas pesquisas em busca de materiais naturais ou sintéticos que possam substituir tecidos corpóreos perdidos. Na odontologia, o tecido ósseo é sem dúvida o mais solicitado nas cirurgias pré-protéticas, no tratamento de defeitos congênitos e deformidades dentofaciais, contribuindo de forma decisiva para a função e a estética (Hislop, Finlay e Moos, 1993).

Os princípios biológicos propostos por Bränemark para reabilitação recomenda aguardar de seis a doze meses após as exodontias para a completa cicatrização do osso alveolar antes da instalação de implantes, esta espera corresponde ao período de completa calcificação do alvéolo para receber um implante. Além disto, o protocolo recomenda um período de mais três a seis meses com o implante sem contato com a cavidade bucal, para que então a gengiva seja novamente incisada e a reabilitação protética seja iniciada (Paolantonio *et al.*, 2001).

Em alguns pacientes, esse tempo de espera para que ocorra osteointegração e a necessidade de longos períodos de uso de provisórios removíveis pode causar problemas psicológicos, sociais, fonéticos e/ou funcionais, sendo imprescindível a realização de uma restauração provisória na mesma consulta ou logo em seguida à instalação do implante (Misch *et al.*, 2004).

No intuito de minimizar estas desvantagens, novas técnicas cirúrgicas de estágio único foram desenvolvidas, isto é, a instalação logo após a exodontia de implantes seguida de provisórios fixos imediatos. Mesmo com esse avanço, as restaurações provisórias devem ficar fora do contato direto oclusal até que a interface osso-implante esteja madura, o que demanda tempo até que reabilitação definitiva possa ser realizada (Norton, 2004). Por isso se buscam materiais e técnicas que possam reduzir o tempo de espera para a conclusão de uma reabilitação protética sobre implantes (Javed e Romanos, 2010).

Existe uma grande variedade de enxertos ósseos desenvolvidos e aplicados em modelos animais para obtenção de uma regeneração óssea mais rápida, dentre estes podemos encontrar os cimentos de fosfato de cálcio e os biopolímeros (Azevedo *et al.*, 2013).

2.3 Enxertos Ósseos

Enxerto ósseo é a denominação usada para o tecido ósseo transplantado de uma área doadora para outra receptora, pode ser usado na forma de partículas, bloco ou segmento em posição sobre, inter ou intraóssea (Puricelli, 2000).

De acordo com a sua origem, podem ser classificados como: autógenos ou autoenxerto quando retirado de um sítio diferente do próprio paciente, isto é, mesmo indivíduo doador e receptor; alógenos, homogêneo ou homoenxerto, quando o doador e o receptor são de uma mesma espécie; xenógenos, heterólogo, xenoenxerto ou heteroenxerto, quando o doador e receptor são de espécies diferentes e finalmente os aloplásticos os quais podem ser de origem mineral ou biosintética (Spiekermann *et al.*, 2000).

O material de enxerto ideal deve preencher os seguintes requisitos: 1) fornecimento ilimitado sem comprometer a área doadora; 2) promover osteogênese; 3) não apresentar resposta imunológica do hospedeiro; 4) revascularizar rapidamente; 5) estimular a osteoindução; 6) promover a osteocondução; 7) ser substituído completamente por osso em quantidade e qualidade semelhante ao do hospedeiro (Artzi *et al.*, 2005).

Porém, não existe um material para enxerto que apresente todas essas características. O osso autógeno é amplamente aceito como padrão para o tratamento de defeitos ósseos, visto que consegue reunir características mais próximas do ideal (Artzi *et al.*, 2005). Sua principal vantagem é o potencial de integração ao leito receptor com mecanismos de formação óssea de osteogênese, osteoindução e osteocondução. Como desvantagem, há necessidade de uma área doadora, potencial de reabsorção e dificuldade de adaptação na área receptora (Kontio, 2004).

Os enxertos autógenos têm sido comumente utilizados pela implantodontia, sendo as áreas intrabuciais as principais doadoras, dentre essas, a tuberosidade da maxila é a região mais frequentemente empregada, seguida pelo ramo ascendente da mandíbula e pela sínfise mandibular; já das áreas doadoras extrabuciais a crista ilíaca é a região mais comumente empregada, seguida pela tíbia (Nóia *et al.*, 2009).

É importante salientar que o sucesso dessa técnica se baseia na fundamentação nos princípios biológicos, experiência clínica e resultados obtidos e fazem com que a técnica seja eleita na maioria das reabilitações orais de pequeno

porte (Kahn *et al.*, 2003). A previsibilidade é o principal fator na eleição deste tipo de material de reconstrução óssea (Schwartz-Arad e Levin, 2005), já que esta é a única técnica que fornece ao leito receptor células com capacidade de neoformação óssea, fatores de crescimento e um arcabouço ósseo semelhante ao leito receptor (Gordh e Alberius, 1999).

No entanto, a limitada quantidade de tecido ósseo no sítio doador, assim como, a elevada morbidade inerente ao procedimento, eventual necessidade de uma nova etapa cirúrgica, risco de infecção e a própria absorção do tecido transplantado, representam restrições atribuídas à técnica (Khan *et al.*, 2005).

Dessa forma, os enxertos homogêneos e heterogêneos, e os substitutos ósseos sintéticos têm sido amplamente estudados como uma alternativa aos enxertos autógenos, devido à facilidade de obtenção em grande quantidade e à sua boa integração com o leito receptor, e são, portanto, considerados como materiais aceitáveis para reconstruções (Davies, 2003).

Os enxertos homogêneos e heterogêneos não contêm células vivas, mas podem apresentar características osteocondutoras ou osteoindutoras quando inseridos aos sítios receptores. Outra vantagem destes, é que não se faz necessário um segundo sítio cirúrgico (doador) e, assim sendo, resultam em menor tempo cirúrgico para realização de reconstruções. Os enxertos atuam como arcabouço de sustentação para o novo osso que será formado com características semelhante ao osso autógeno, embora seja mais lento a revascularização e osseointegração (Ellis e Sinn, 1993).

Outros tipos de substitutos ósseos têm sido pesquisados, dentre eles destacam-se os materiais sintéticos ou aloplásticos, pela grande disponibilidade e por dispensarem o procedimento cirúrgico de um sítio doador (Norton e Wilson, 2002); as biocerâmicas usadas em próteses clínicas, as quais podem ser produzidas pelo homem e não serem rejeitados pelo organismo (Hench e Wilson, 1993). O vidro bioativo também foi considerado um substituto ósseo compatível já que permite o crescimento e a divisão de células em cultura e o contato íntimo com células vivas na sua superfície, além de não produzir reação inflamatória, levando a disseminação de tecido ósseo ao redor de sua superfície (Ribeiro, 2003).

Outro material que vem sendo bastante estudado como substituto ósseo é a hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, um sal à base de cálcio e fosfato. São características da mesma: ser biocompatível, causar mínimos danos inflamatórios, aderir-se

firmemente ao leito ósseo receptor e formar um arcabouço para o reparo ósseo. No entanto, possui como desvantagem a impossibilidade de sua fixação ao leito receptor, visto que o bloco de hidroxiapatita cede e fratura, quando se tenta utilizar parafusos para sua fixação (Rubin e Yaremchuck, 1997).

Em um estudo no qual se avaliou o processo de regeneração óssea em coelhos utilizando hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea, foi possível observar que nos grupos nos quais se utilizou a quitosana associada ou não a medula óssea, houve maior deposição de tecido ósseo, bem como reações celulares mais evidentes que os grupos comparados. Concluindo-se, dessa forma, que a quitosana acelerou e maximizou o reparo ósseo, apresentando grande potencial osteogênico, atuando como um biomaterial osteoindutor (Azevedo *et al.*, 2013).

Considerando-se que a maior parte das lesões ósseas tratadas anualmente, em todo o mundo, requerem o emprego de técnicas de enxertia (Einhorn, 1999), a busca de manobras curativas mais efetivas e com menor custo biológico, justificam a busca de biomateriais de preenchimento com características físico-químicas que possibilitem sua integração ao leito receptor e também que interajam ativamente com os componentes moleculares e celulares presentes no local (Dietmar e Garcia, 2005).

2.4 Biomateriais

Uma das definições atuais estabelece que os Biomateriais são “materiais utilizados em dispositivos médicos ou em contato com sistemas biológicos” (Ratner, 2004), enquanto que na definição clássica, biomaterial é considerado “parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (Helmus e Tweden, 1995).

Um biomaterial deve apresentar um comportamento mecânico adequado, possuir o mínimo de reação com o organismo e ser biocompatível. Pode-se definir como um biomaterial compatível, aquele que não influencia negativamente o seu ambiente biológico, com suas propriedades físicas sendo mantidas estáveis quando utilizados *in vivo* (Widu *et al.*, 1999).

Os biomateriais utilizados clinicamente induzem diferentes respostas do tecido e, em função do tipo de interface desenvolvida entre o tecido e o implante,

podem ser classificados em: Bioinertes, Bioativos, Bioabsorvíveis e Biodegradáveis (Hench e Wilson, 1993).

Os Bioinertes são biomateriais bem tolerados pelo organismo, praticamente sem liberação de nenhum tipo de componente e não causam reação. Esses materiais tendem a ser envolvidos por uma cápsula fibrosa que o isolam do meio biológico. A espessura dessa cápsula fibrosa depende de diversos fatores, tais como, as condições do implante, do tecido e carga mecânica existente na interface tecido/implante (Hench e Wilson, 1993).

Já os Bioativos são os materiais que favorecem a ligação química entre o material implantado e o tecido ósseo (osseointegração), sem a presença de invólucros fibrosos. Em função da similaridade química entre tais materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução através de recobrimento por células ósseas. Quando um material bioativo é implantado no corpo, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorre na interface tecido/implante. Essas reações por vezes resultam em uma ligação interfacial de natureza química e não física. Os materiais bioativos podem ainda ser classificados em osteoindutores, que promovem resposta intracelular e extracelular na interface, e osteocondutores, que promovem uma superfície biocompatível favorecendo o desenvolvimento das células ósseas (Hench e Wilson, 1993).

Os Bioabsorvíveis são os biomateriais fagocitados pelo organismo após certo período de contato com o tecido. Estes materiais possuem papel fundamental em algumas aplicações clínicas, pois são desnecessárias novas intervenções cirúrgicas para a retirada de material implantado (Hench e Wilson, 1993).

E finalmente os materiais Biodegradáveis são aqueles degradados pelo organismo durante um período de tempo, e cujos produtos da degradação não são tóxicos (Hench e Wilson, 1993).

Assim, a seleção de um biomaterial deve ser iniciada com a identificação das propriedades do mesmo. Este deve apresentar, além das propriedades fundamentais, propriedades específicas para determinada aplicação. Como essas propriedades são extremamente sensíveis às variações de estrutura do material em escala micro ou nanométrica, é fundamental que se conheça a correlação entre microestrutura e as propriedades desejadas (Soares, 2002).

Todas as classes de materiais, isto é; metais, cerâmicas, polímeros e compósitos são comumente utilizados em cirurgias reconstrutivas de órgãos ou

tecidos danificados (Volkmer, Breuer e Santos, 2006). Dentre os poliméricos, alguns estudos relataram que a quitosana, um polímero de origem natural tem sido muito estudado devido as suas propriedades de favorecer neoformação óssea por estimular a liberação de citocinas, favorecendo a angiogênese e osteogênese (Muzzareli *et al.*, 1994; Ueno *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Gorzelanny *et al.*, 2010).

2.5 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, esta última é o segundo biopolímero mais abundante na natureza, sendo o primeiro a celulose. A quitina pode ser encontrada nas carapaças dos crustáceos, nos exoesqueletos dos insetos e nas paredes celulares de fungos (Torres, *et al.*, 2005).

Já a quitosana pode ser encontrada em pequenas quantidades em alguns fungos, principalmente aqueles da classe Zygomycetes (Stamford, *et al.*, 2007) ou pode ser obtida por processos enzimáticos de alto custo e baixa produtividade, inviabilizando a produção em grande escala (Campana Filho *et al.*, 2007). Para que possa ser produzida em escala industrial, a quitosana é obtida através da desacetilação alcalina da quitina (Tharanathan e Kittur, 2003).

Em 1859, o pesquisador Rouget descobriu a forma desacetilada da quitina, obtendo pela primeira vez a quitosana. Para tanto, o mesmo colocou quitina em ebulição com solução de hidróxido de sódio, resultando em um material solúvel em ácidos orgânicos (Trindade Neto, 2008).

Quimicamente falando, quitina e quitosana são polissacarídeos lineares contendo as unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4). Durante a desacetilação alcalina da quitina para obtenção da quitosana, observa-se a transformação parcial dos grupos acetamidos (NHCOCH₃) em grupos aminos (NH₂) (Figura 4). Essa transformação faz com que a quitosana apresente características interessantes, como por exemplo melhor solubilidade e maior reatividade. A amina primária da quitosana reage facilmente, sendo possível a obtenção de novos compostos e derivados (Campana Filho, 2007).

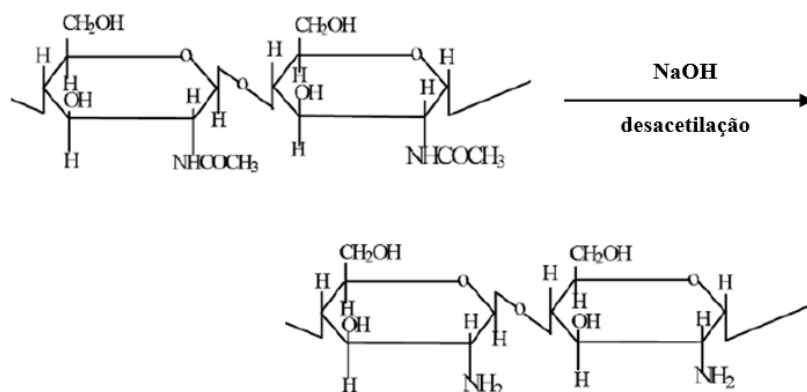


Figura 4 – Representação do processo de obtenção da quitosana por meio da desacetilação da quitina (Azevedo *et al.*, 2007).

De acordo com o grau médio de acetilação (GA), que corresponde a proporção de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) em relação às de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcN), pode-se obter quitosanas com diferentes características físico-químicas, como; solubilidade, Potencial Hidrogeniônico (pH) e viscosidade (Singla, Chawla, 2001). A medida que se aumenta o grau de desacetilação, aumenta-se também a possibilidade de degradação do polímero, por esse motivo torna-se difícil a obtenção de uma quitosana com elevado grau de desacetilação (Le Dung *et al.*, 1994).

A quitina possui um GA > 0,5 e é insolúvel em meio ácido. A quitosana é solúvel em meio ácido e possui GA ≤ 0,5 (Guinesi, Esteves e Cavalheiro, 2007). O grau de desacetilação da quitosana varia de acordo com as condições de processamento e obtenção da quitina tais como: concentrações das soluções ácidas, temperatura e presença de oxigênio (Santos, 2006).

Pesquisas com quitina e quitosana tem crescido bastante em diversas áreas, como na agricultura e indústrias de alimentos; mas notadamente, na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de cosméticos e biomateriais (Tonhi e Plepis, 2002).

Evans e Kent (1962) observaram que a quitosana, devido a sua estrutura policatiônica diametralmente oposta, quanto à carga elétrica, a das estruturas celulares que apresentam a superfície aniônica, proporcionava a capacidade de se ligar a um grande número de células de mamíferos, representando os primeiros indícios de sua possível aplicabilidade na área da saúde.

A quitosana possui grande aplicabilidade no campo da engenharia biomédica e de biomateriais, por ser um material biocompatível, atóxico e biodegradável (Ge *et*

al., 2004; Azevedo, 2007; Fraga *et al.*, 2011), como também devido à sua habilidade em acelerar a cicatrização de lesões cutâneas (Jayakumar *et al.*, 2011). Apresenta ainda propriedades favoráveis como por exemplo a bioatividade. Alguns estudos indicam também propriedades antimicrobianas (Devlieghere, Vermeulen, Debevere, 2004; Wang *et al.*, 2004; Jayakumar *et al.*, 2011). Seus metabólitos residuais também são atóxicos tornando-a, um material de grande potencial de aplicação na área médica-farmacêutica (Hirano, 1996).

Craveiro, Craveiro e Queiroz (1999) utilizaram aplicações tópicas de quitosana por meio de pomadas e bandagens e observaram que a mesma acelera a cicatrização de ferimentos e abscessos infectados por *Staphylococcus*, pois diminuíram o tempo de coagulação, que é fundamental na cicatrização de ferimentos ou em procedimentos cirúrgicos

Estudos realizados apontam que a quitosana tem também a capacidade de favorecer neoformação óssea. Segundo Pogorelov, Sikora e Bumeyster (2011), o compósito quitosana/hidroxiapatita, implantados na tíbia de ratos, apresentou boas propriedades de osteocondução e ainda apresentou a propriedade de biodegradação praticamente completa. Tais autores sugeriram que a substituição completa do implante de quitosana-hidroxiapatita porosa por tecido ósseo recém-formado no interior da falha óssea em ratos ocorre até 24 dias de implantação.

Fraga *et al.* (2011) também estudaram a neoformação óssea produzida pela quitosana; neste caso, produziram membranas de quitosana com hidroxiapatita pelo método biomimético modificado e encontraram como resultados uma camada homogênea cobrindo toda a superfície da membrana e a produção de uma camada de hidroxiapatita semi-cristalina, semelhante a fase mineral do osso humano.

Borah, Scott e Wortham (1992) foram os primeiros a descrever o potencial da quitosana em promover osteogênese em defeitos ósseos de coelhos, nesse estudo todos os defeitos foram preenchidos por tecido ósseo regenerado, reforçando o interesse da comunidade científica pela aplicabilidade da quitosana como biomaterial na regeneração óssea. A partir de então, muitos trabalhos passaram a avaliar o seu potencial osteocondutor e osteoindutor.

Em um estudo realizado por Azevedo *et al.* (2013) foi avaliado o processo de regeneração óssea em coelhos utilizando hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea. Foi possível observar por meio de avaliação histológica descritiva e comparativa que nos grupos nos quais se utilizou a quitosana associada

ou não medula óssea, em ambos os momentos estudados, isto é 30 e 60 dias; houve maior deposição de tecido ósseo, bem como reações celulares mais evidentes que nos grupos comparados. Concluindo-se dessa forma que a quitosana acelerou e maximizou o reparo ósseo, atuando como um biomaterial osteoindutor.

Jung *et al.* (2007) avaliaram *in vivo* o efeito do tratamento de membranas de quitosana sobre o processo de regeneração óssea em defeitos criados em calvária de rato. Foi observado que no grupo controle, preenchido apenas com coágulo sanguíneo, ocorreu uma pequena formação de tecido conjuntivo e pouca neoformação óssea reparativa nas margens do defeito. Enquanto que nos grupos que tiveram a inserção da quitosana, no período de 2 semanas, foi encontrado um número residual de fibras envolvido por tecido conjuntivo e no grupo avaliado após 8 semanas; já havia osso em estágio de maturação. Esses resultados, também comprovaram que a quitosana, colaborou para a formação de tecido ósseo.

Esse efeito pode ser explicado pelas características da quitosana, que é um polissacarídeo catiônico que apresenta estrutura semelhante aos glicosaminoglicanos, os quais são os principais componentes da matriz extracelular de ossos e cartilagens. Outra explicação para tal resultado é o fato da quitosana atuar atraindo íons cálcio, favorecendo assim, o processo de cicatrização óssea (Khor e Lim, 2003). A quitosana tem ainda a capacidade de ativar os macrófagos, que liberam fatores de crescimento, promovendo a cicatrização dos tecidos (Ueno *et al.*, 2001; Gorzelanny *et al.*, 2010).

A quitosana apresenta ainda vantagens para a formação de sistemas de liberação de fármacos, tais como, a habilidade de controlar a liberação dos agentes ativos e dispensar o uso de solventes orgânicos durante a síntese de partículas, devido à sua solubilidade em meio aquoso ácido (Dash *et al.*, 2011).

Outra vantagem da quitosana seria a biodegradação, promovida pela lise das suas ligações glicosídicas, por enzimas animais, vegetais e humanas (Muzzarelli, 1992), bem como propriedades mecânicas compatíveis com as do osso, em razão do arranjo paralelo de suas pontes de hidrogênio, proporcionando estabilidade frente a cargas mecânicas desde os estágios iniciais do processo de reparo (Jung *et al.*, 2007).

Pesquisadores utilizam a quitosana, com diferentes apresentações, associada a outras substâncias; como fatores de crescimento, fitoterápicos ou associado a outros biomateriais, na tentativa de agrupar as vantagens isoladas de cada um,

resultando em um biomaterial com propriedades desejadas, favorecendo a aplicação clínica do mesmo (Ge *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2013).

2.6 Esferas de quitosana

A seleção e desenho-de-produto de um polímero são tarefas bastante complexas, devido à diversidade própria das estruturas e necessidade do completo entendimento da superfície e propriedades do polímero que podem fornecer as funções químicas, interfacial, mecânica e biológica desejadas (Pillai e Panchagnula, 2001).

Vários são as apresentações da quitosana, como também os métodos de preparação da mesma para liberação de fármacos. Alguns destes, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Tipos de apresentação e métodos de preparação da quitosana para liberação de fármacos.

| Tipo de apresentação | Método de Preparação |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Tabletes | Matriz revestida |
| Cápsulas | Capsulação |
| Esferas | Emulsão por reticulação |
| | Coacervação Precipitação |
| | Spray-drying |
| | Geleificação Iônica |
| | Método de peneiração |
| Nanopartículas | Emulsão |
| | Coacervação Precipitação |
| Filmes | Moldagem de solução |
| Gel | Reticulação |

Fonte: Dash *et al.* (2011)

Dentre essas diversas apresentações, destacam-se as micropartículas de sistemas matriciais poliméricos (Suave *et al.*, 2006). Essas micropartículas são subdivididas em esferas e cápsulas, de acordo com sua estrutura. São consideradas esferas as partículas compactas constituídas por uma rede polimérica na qual a substância ativa se encontra distribuída. Enquanto que são consideradas cápsulas as partículas formadas por um núcleo contendo o agente ativo recoberto por uma camada de polímero de espessura variável (Batycky *et al.*, 1997). A Figura 5, representa a estrutura de uma esfera e uma cápsula.

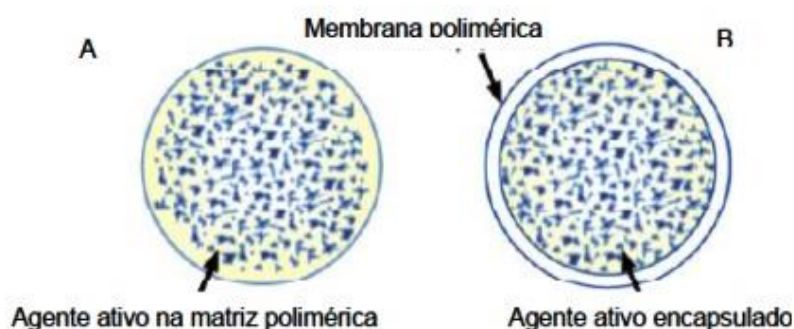


Figura 5 – (A) Esfera: o agente está distribuído em uma matriz polimérica; e (B) Cápsula: o agente ativo está envolvido pelo agente polímero (Suave *et al.*, 2006).

Como forma de preparação das esferas de quitosana destaca-se a Geleificação Iônica ou Ionotrópica. Essa técnica consiste na reticulação iônica de grupos de polímero com contra-íons multivalentes. As partículas são formadas após a adição de uma solução à outra (Shu e Zhu, 2000). Devido à natureza catiônica da quitosana em solução ácida, em contato com polieletrólitos aniônicos ocorre a imediata atração das moléculas, formando complexos insolúveis em água. Como exemplos de polieletrólitos aniônicos podem ser citados: alginato, sulfatos orgânicos e polifosfatos (Krajewska, 2004).

Ko *et al.* (2002) prepararam esferas de quitosana pela técnica de geleificação ionotrópica empregando o tripolifosfato de sódio (TPP) como agente físico de reticulação, encapsulando a felodipina. A liberação do fármaco a partir das esferas de quitosana reticuladas com TPP diminuiu quando o tempo de reticulação foi aumentado. Esse método possui como vantagem a não utilização de agentes de reticulação que possam induzir efeitos tóxicos ou outros efeitos indesejáveis (Holanda, 2011).

Um dos problemas encontrados nos polímeros naturais, como é o caso da quitosana, é a fácil degradação dos mesmos. Este problema pode ser minimizado, modificando o polímero com agentes reticulantes. Exemplos destas modificações podem ser a reticulação da quitosana utilizando-se glutaraldeído (Azevedo, 2002) e reticulação da quitosana utilizando-se tripolifosfato de sódio (Ko *et al.*, 2002).

O processo de reticulação pode ser físico ou químico (Holanda, 2011). A reticulação química ocorre entre as diversas cadeias poliméricas e se dá por reações químicas entre os grupos funcionais presentes nas cadeias poliméricas ou entre estas e outros compostos químicos. Como, por exemplo, a vulcanização da

borracha com a utilização de enxofre. Já a reticulação física ocorre quando o processo de reticulação se dá sem a formação de ligações químicas primárias entre as cadeias poliméricas (Fernandes, 2009a). A Figura 6 representa as interações formadas entre a quitosana e o Tripolifosfato de Sódio - TPP ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$).

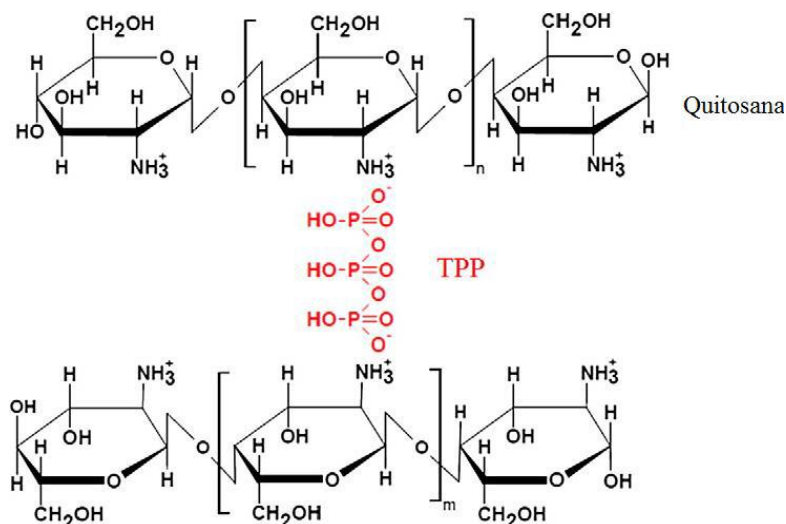


Figura 6 – Representação das interações formadas entre a quitosana e o Tripolifosfato de Sódio - TPP ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) (Kašpar *et al.*, 2013).

Ma e Liu (2010) fabricaram esferas de quitosana pelo método da geleificação ionotrópica, para tanto fizeram a quitosana fluir por uma agulha formando gotículas as quais eram recebidas em uma solução de coagulação onde as esferas eram formadas. Os mesmos usaram o TPP como agente de coagulação, por considerarem que outros agentes de coagulação comumente usados; como o glutaraldeído e o etileno glicol éter diglicídico (EGDE), apresentam toxicidade fisiológica, já o TPP é um agente de ligação cruzada não tóxico.

As moléculas de TPP carregadas negativamente podem reagir com os grupos amino positivos da quitosana, resultando na formação das esferas. Os autores consideram essa técnica simples e de fácil operação. No estudo em questão os autores observaram que as esferas carregadas com a proteína albumina de soro bovino (BSA) tendiam a aderir uns com os outros, para solucionar este problema, adicionaram etanol na solução de TPP para diminuir a densidade e a tensão superficial da solução de coagulação (Ma e Liu, 2010).

2.7 Plantas Medicinais

Desde a antiguidade que o homem utiliza a natureza, por meio das plantas medicinais para tratar muitos tipos de enfermidades (Brasil, 2006). Porém, apenas em 1978, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu o uso de fitoterápicos para diversas finalidades, tanto terapêuticas quanto profiláticas.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define plantas medicinais como sendo as espécies vegetais que possuem em um de seus órgãos, ou em toda a planta, substâncias que se administradas ao ser humano ou a animais, por qualquer via e sob qualquer forma, exercem algum tipo de ação farmacológica (OMS, 2003).

O Brasil possui uma flora bastante diversificada e com grande potencial para exploração de plantas medicinais, entretanto, apesar do interesse crescente da sociedade e da comunidade científica pelo assunto, as pesquisas desenvolvidas ainda são insuficientes para preencher as lacunas deixadas pela utilização popular de tais substâncias. Sendo assim, a maior parte das plantas medicinais nativas continua sendo empregada da mesma forma tradicional e apenas baseada na experiência de uso, sendo raros os exemplos de produtos registrados do Brasil contendo plantas (Almeida, 2003).

No entanto, é importante a informação de que uma planta tem sido usada por um determinado grupo por um longo período de tempo, pois isso pode sugerir a existência de uma droga potencialmente adequada (Maciel *et al.*, 2007a). Sendo assim, é fundamental a identificação da planta, seu registro fotográfico e catalogação em laboratório, bem como testes biológicos específicos para avaliação precisa do uso terapêutico da espécie vegetal em questão (Albuquerque e Hanazari, 2006; Maciel *et al.*, 2007a).

As plantas medicinais são vistas pelos usuários dos serviços públicos de saúde como uma alternativa apenas aos elevados custos dos medicamentos convencionais e não como uma opção terapêutica devido às propriedades curativas das mesmas. O fato dos profissionais de saúde não possuírem o conhecimento sobre as indicações e cuidados no uso de plantas medicinais também pode ser evidenciado como um problema para consolidação do uso dessa terapia (Santos *et al.*, 2009).

Na Odontologia, pesquisas com plantas medicinais são ainda mais recentes, destacando-se os estudos com substâncias fitoderivadas que tem estimulado a

avaliação de diferentes produtos vegetais com possíveis propriedades terapêuticas (Borba *et al.*, 2008; Sousa, 2010; Matos, 2011; Sousa, Oliveira e Nicolete, 2011).

O principal intuito na indicação do uso de fitoterápicos não é substituir os medicamentos registrados e já comercializados, mas aumentar a opção terapêutica dos profissionais de saúde ofertando medicamentos equivalentes, também registrados, talvez mais baratos, com mecanismos de ação mais adequados e com indicações terapêuticas complementares às medicações já existentes (Lapa *et al.*, 2007).

Os produtos derivados de plantas medicinais apresentam um crescimento no mercado mundial estimado em 10 a 20% ao ano. E as principais razões que estimulam esse crescimento são: valorização de hábitos de vida saudáveis, descoberta de novos princípios ativos naturais, comprovação científica da ação de espécies vegetais que originaram novas formulações fitoterápicas (Sousa e Miranda, 2003).

O modo de utilização desses produtos é muito variado, podendo ser empregado em aplicações internas ou externas. As internas podem ser: chás, sucos, xaropes, tinturas (extração de ervas com solução alcoólica ou hidroalcoólica) ou em forma também de extrato (preparação concentrada). As aplicações externas podem ser: na forma de cataplasma (erva pulverizada ou macerada), unguento (similar a cataplasma, porém utiliza solventes com consistência mais pastosa), óleos (dissolução simples da tintura em um óleo fixo, azeite, girassol, algodão), pomadas, pasta, creme, loções, sabões e gel (Albuquerque e Hamazazi, 2006).

Os produtos do metabolismo secundário das plantas são formados por várias rotas biossintéticas culminando em moléculas com diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais e muitas dessas moléculas podem ser princípios ativos com finalidade farmacológica (Alves, 2001).

Os metabólitos secundários podem ser classificados em três classes: 1) compostos fenólicos, como os flavonóides, polifenóis, antocianinas, taninos e lignina; 2) terpenos, como óleos essenciais, piretroides, giberelinas, carotenóides, lactonas e saponinas; e 3) alcalóides, com várias substâncias com efeito sobre o sistema nervoso, como nicotina, cafeína, cocaína, atropina, morfina e codeína (Peres, 2004).

Esses produtos do metabolismo secundário ainda não possuem, completamente descritas suas funções para a própria planta, mas se sabe que está associada à defesa da mesma contra herbívoros, ataque de patógenos, radiação

solar e ainda na atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos simbiontes (Montanari, 2002). Dessa forma, o crescente interesse mundial pelo uso de plantas medicinais vem incentivando pesquisadores de várias áreas a desenvolverem projetos multidisciplinares envolvendo, plantas medicinais dentre estas, a *Dysphania ambrosioides* L. Mosyakin & Clemants - Mastruz (Leal, 2008).

2.8 *Dysphania ambrosioides* L. Mosyakin & Clemants - Mastruz

Segundo a APG III - *Angiosperm Phylogeny Group*, isto é o Grupo para a Filogenia das Angiospermas; o mastruz não se encontra mais no gênero *Chenopodium* e sim no gênero *Dysphania*, sendo *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants o nome aceito e correto atualmente, em substituição à *Chenopodium ambrosioides* L. (APG III, 2009). Tal atualização também se encontra disponível na Lista de Espécies da Flora do Brasil a qual é parte integrante do Programa REFLORA que conta com mais de 500 taxonomistas, brasileiros e estrangeiros, responsáveis dentre outras atribuições pela atualização de informações sobre nomenclatura, nomes aceitos versus sinônimos. A espécie *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants pertence à Família *Amaranthaceae* e ao Gênero *Dysphania* (Senna, 2015).

Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants é descrita botanicamente como uma planta herbácea de até 1 m de altura, ramificada, caule sulcado, geralmente glabro, e folhas simples de filotaxia alterna. As folhas dos ramos inferiores possuem bordo denteado e são maiores chegando até 6 cm de comprimento. As folhas dos ramos superiores e floríferos são menores e de bordo liso. A folha apresenta a superfície adaxial glabra e abaxial levemente pilosa, as vezes glabra. As flores são pequenas, esverdeadas, hermafroditas e algumas femininas, reunidas em inflorescências axilares ou panículas terminais. O perigônio é tripartido, persistente no fruto. As sementes são pequenas, com cerca de 1 mm de diâmetro, de cor preta e brilhantes. Esta planta possui uma ampla distribuição pelo mundo. Sendo utilizada em muitos lugares como vermífugo, antiespasmódico, tônico, auxiliar da digestão, anti-reumático e antipirético. A Organização Mundial da Saúde elenca a mesma como sendo uma das espécies mais utilizadas entre os remédios tradicionais no mundo inteiro (Lorenzi e Matos, 2002).

Estudos demonstram que a espécie possui atividades moluscicida (Hmamouchi *et al.*, 2000), fungicida (Delespaul *et al.*, 2000), antibacteriana (Tôres *et al.*, 2005; Brito, Carvalho e Albuquerque, 2007;), antineoplásica (Nascimento *et al.*, 2006), cicatrizantes (Brito, Carvalho e Albuquerque, 2007; Matos, 2011), antihelmínticas (Almeida *et al.*, 2007; Brito, Carvalho e Albuquerque, 2007), antiedematogênica (Grassi, 2011).

No Brasil, o *Chenopodium ambrosioides* L, atualmente chamado de *Dysphania ambrosioides* (L.), possui vários nomes populares: Ambrósia, Quenopódio, Erva-de-Santa Maria, Erva-Pomba-Rola, Erva-Formigueira, Chá-do-México, Mastruço, Mastruz, Erva-Matapulga e Uzaidela (Di Stasi *et al.*, 1989; Lima, Magalhães e Santos, 2011).

Esta planta produz diversos metabólitos secundários responsáveis por suas atividades farmacológicas, tais como compostos fenólicos, catequinas, esteróides, flavonóides, taninos, triterpenóides e óleo essencial, sendo considerados os princípios ativos responsáveis por suas propriedades terapêuticas (Marins *et al.*, 2011).

Um estudo realizado por Jardim *et al.* (2008) identificou 13 diferentes compostos presentes no óleo essencial do mastruz, nas seguintes concentrações: 80% do ascaridol (Figura 7), 3,9% de carvacrol, 2,0% de p-cimeno, 0,9% de α -terpineno, 0,8% de acetato de piperitol, 0,8% de p-cimen-8-ol, 0,6% de α -terpineol, 0,6% p-menta-1,3,8-trieno, 0,5% de piperitone, 0,3% de álcool benzílico, 0,3% de p-cresol e 0,2% de acetato de cravil. Outros estudos mostraram o ascaridol como principal componente do óleo essencial da planta coletada em Madagascar (Cavalli *et al.*, 2004), Togo (Koba *et al.*, 2009) e no Mediterrâneo Oriental (Dembitsky *et al.*, 2008).

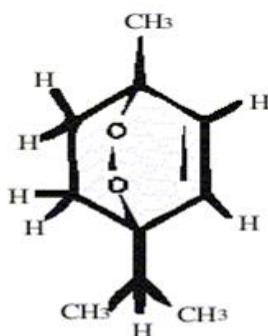


Figura 7 – Estrutura química do ascaridol, composto presente extrato de mastruz. (Parra *et al.*, 2000).

Gadano, Gurni e Carballo (2006) relataram que altas doses desse componente podem causar irritação de pele e mucosas, cefaléia, taquicardia, parada respiratória, danos renais e hepáticos.

No entanto, Sá (2013) encontrou no óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* extraído das folhas, os constituintes majoritários sendo α -terpineno (42,14%) e α -terpinenil-acetato (31,57%). O conteúdo de ascaridol, geralmente relatado como majoritário em outros estudos, foi de apenas 0,87%. Tal fato, chama atenção para a observação do local de coleta da planta como sendo um importante fator a ser considerado para a análise do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*.

O α -terpineno também foi o componente majoritário no óleo essencial da planta coletada na Nigéria (Gbolade et al., 2010), na Colômbia (Jaramillo et al., 2012) e na Índia (Singh et al., 2008). Entretanto, outro estudo na Índia também encontrou m-cimeno como majoritário, correspondendo a 43,90% do óleo (Prasad et al., 2010). O p-cimeno correspondeu a 50% da constituição química do óleo essencial de material coletado em Camarões (Tapondjou et al., 2002).

Outro composto encontrado que também merece atenção farmacológica é o monoterpenóide denominado carvacrol (Koba et al., 2009), por ter boa eficácia anti-inflamatória (Lima et al., 2013) e antioxidante (Muñoz-Acevedo, et al., 2009), além de ter propriedades bactericidas e fungicidas (Botelho et al., 2011).

Um outro estudo com o extrato de acetato de etila das folhas frescas de *C. ambrosioides* L, obteve os flavonóides campferol e um até então desconhecido, o qual foi nomeado ambroside (Arisawa et al., 1971). Campferol é uma flavonóide antioxidante com conhecida ação na saúde óssea (Pang et al., 2006).

Um fator que também altera a composição do óleo essencial de *C. ambrosioides*, é a época em que a planta é coletada. Torres et al. (2003) analisaram a composição do óleo essencial da espécie coletada na Argentina em três épocas do ano: verão, outono e primavera. No verão, o componente majoritário foi α -felandreno (40,0%), no outono foram encontrados α -pineno (32,7%) e limoneno (32,5%) em maiores concentrações, já na primavera, essas proporções reduziram para 17,4% para α -pineno e 27,7% para limoneno. Com relação ao conteúdo de ascaridol, esse se mostrou sem muitas variações durante as três estações, sendo encontrados 8,6% no verão, 9,2% no outono e 9,5% na primavera.

No Nordeste do Brasil, onde são largamente utilizadas, as folhas do mastruz são batidas no liquidificador com leite para tratamentos de gripe e fraturas ósseas. As folhas também são utilizadas, amarradas no local fraturado com a intenção de agilizar o reparo ósseo (Moraes *et al.*, 2005).

Estudo realizado por Sousa (2010) sugere que o extrato de mastruz é favorável ao processo de reparo de dentes de ratos reimplantados, quando comparado ao extrato de Aroeira (*Schinus Terebinthifolius* Raddi) e ao soro fisiológico. Uma vez que o extrato do mastruz apresentou efeitos antiinflamatório e cicatrizante nos tecidos pulpar e periodontal, pois foi capaz de reduzir os polimorfonucleares (PMNs), abscesso e necrose no ligamento periodontal, além de estimular o reparo do osso alveolar por meio da proliferação fibroblástica e induzir a osteogênese do osso alveolar.

Em outro estudo cujo objetivo foi avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico do mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) no processo de reparo ósseo de ratos, comparando-o com a esponja de fibrina e coágulo sanguíneo, conclui-se que a regeneração óssea ocorreu de forma mais acelerada no grupo em que foi utilizado o extrato de mastruz, já que foi o único que apresentou osso neoformado fechando as feridas ósseas em todas as amostras do seu grupo (Penha, 2012).

Pinheiro Neto *et al.*, (2015) avaliaram em coelhos o efeito do cataplasma de mastruz (*Chenopodium ambrosioides*) aplicado diretamente no defeito ósseo, comparando-o com o diclofenaco de sódio e o soro fisiológico. A evolução da reparação óssea foi verificada após 30 e 45 dias por meio da análise histológica. Essa análise revelou aos 30 dias uma maior formação de tecido ósseo maduro no grupo do cataplasma do mastruz comparado aos demais grupos. Por tanto, concluíram que o *Chenopodium ambrosioides* é um agente terapêutico promissor para regeneração óssea.

Silva *et al.* (2006) avaliaram o perfil da utilização e da prescrição de fitoterápicos no município de Maracanaú (CE) por meio de um levantamento no Programa Farmácias Vivas do Sistema Público de Saúde (SUS). Constataram que o laboratório de manipulação produz 15 especialidades fitoterápicas e que o gel de mastruz a 10%, produzido a partir das folhas da planta, é empregado como anti-inflamatório tópico usado, por meio de massagem da região afetada, para tombos e luxações.

Pereira (2009) realizou um estudo com extrato bruto hidroalcoólico (EBH) da folha da *C. ambrosioides* para avaliação toxicológica e ação na resposta inflamatória em camundongos, nas doses de 5, 50 e 500 mg/kg. O mesmo observou que o EBH na dose de 5mg/Kg não apresentou sinais de toxicidade, enquanto a dose de 50mg/Kg induziu sinais de toxicidade renal e a dose de 500mg/Kg induziu alterações de comportamento, fisiológicas e sinais de hepatotoxicidade.

Com relação à ação na resposta inflamatória; no modelo de edema de pata, isto é, de inflamação aguda, o EBH na dose de 5mg/Kg administrado após 3 horas pelas vias Intraperitoneal, subcutânea e oral, inibiu significativamente o desenvolvimento do edema, sendo a diminuição mais expressiva no grupo tratado por via oral. Quando se avaliou o peso das células presente no granuloma por corpo estranho (inflamação crônica), verificou que o tratamento diário por via oral durante 6 dias consecutivos, reduziu a formação do granuloma e que após 17 dias de tratamento ocorreu inibição da formação do granuloma como um todo, o que ocorreu de maneira mais significativa com a dose de 5mg/Kg com relação ao grupo controle (recebeu apenas água apiogênica) (Pereira *et al.*, 2009).

Estes autores observaram ainda que o EBH não provocou alteração no fluxo celular na peritonite induzida por lipopolissacarídeos (LPS) da *Escherichia coli*, a qual representa a inflamação induzida por microrganismos. Ressaltaram ainda que, o número de células da medula óssea, peritônio e linfonodos não foram modificadas pelo tratamento com EBH em nenhuma das três concentrações estudadas. Sendo assim, concluíram que a dose terapêutica de 5mg/Kg do EBH de *Chenopodium ambrosioides* não promove toxicidade, e ainda apresenta efeito anti-inflamatório tanto para inflamação aguda como crônica (Pereira, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- Quitosana de médio peso molecular - Sigma Aldrich® - Grau de desacetilação de 75-85% (Lote SLBF5331V);
- Ácido Acético Glacial - Neon (Lote 21352);
- Tripolifosfato de sódio - Sigma Aldrich® (Lote 12421JIV);
- Extrato alcoólico de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants;
- Phosphate Buffered Saline (PBS)- pH 7.4 Sigma Aldrich® (Lote SLBC5890);
- Lisozima- Lysozyme from chicken egg White- Fluka (Lote BCBG4804V).

3.2 Metodologia

3.2.1 Tipo e local da pesquisa

A pesquisa foi do tipo laboratorial, qualiquantitativa e desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO), localizado na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

O fluxograma a seguir representa as etapas da metodologia empregada na pesquisa (Figura 8).

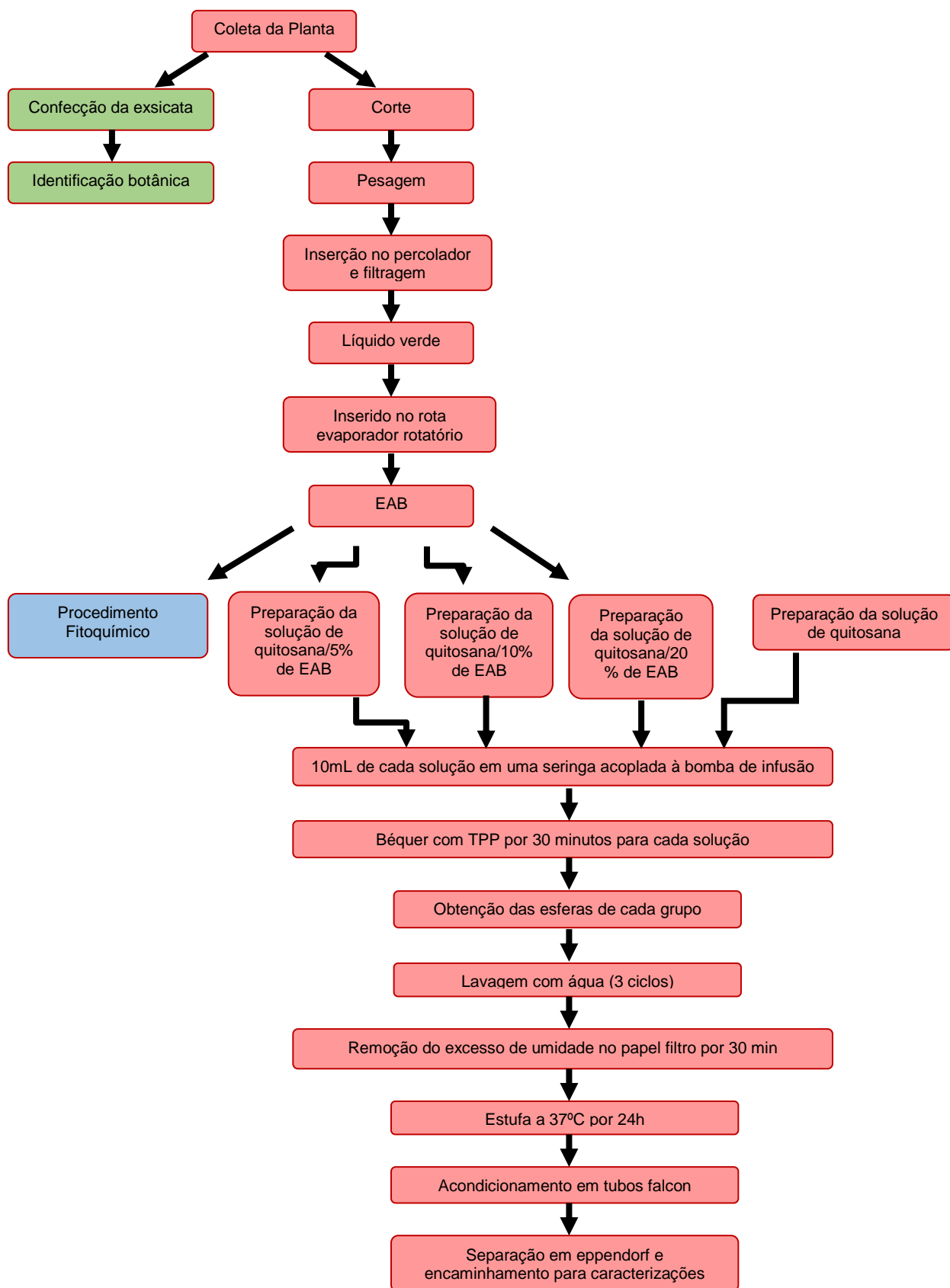


Figura 8 – Fluxograma das etapas da metodologia empregada na pesquisa (Autor, 2016).

3.2.2 Coleta da Planta e Identificação Botânica

A planta foi cultivada e coletada no Horto de Plantas Medicinais do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarmM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) em João Pessoa- PB, onde é cultivada (Figura 9). A coleta foi realizada pela pesquisadora às 7 horas do dia 11/05/2015.



Figura 9 – Espécie vegetal no Horto de Plantas Medicinais do IPeFarmM (Autor, 2016).

Com a finalidade de identificar botanicamente a espécie vegetal utilizada no estudo, partes aéreas (caule, folhas e frutos) de plantas adultas frescas foram prensadas (Figura 10), em seguida postas para secagem em estufa artesanal por 72 horas, para confecção de exsiccatas.



Figura 10 – Prensa utilizada (A) e imagem espécie vegetal após processo de secagem na estufa artesanal (B) (Autor, 2016).

A identificação botânica foi realizada pelo técnico F.E.M.P. do herbário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da UFCG, localizado na cidade de Patos-PB. Amostras representativas das exsicatas foram depositadas no Herbário CSTR, sob número de tombo – CSTR 6015 (Figura 11).

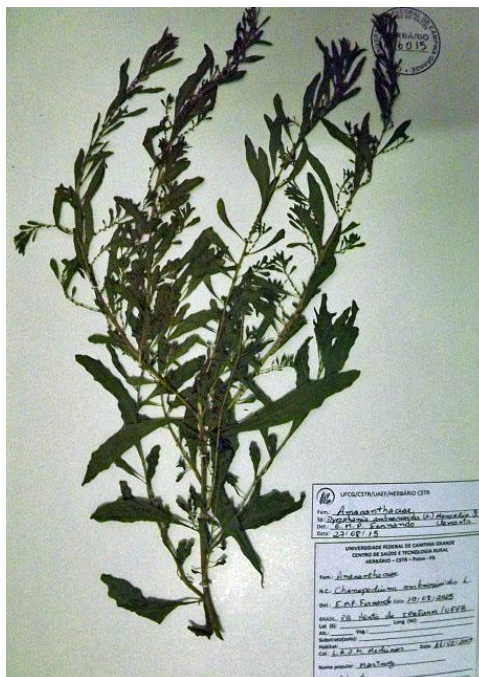


Figura 11 – Exsicata depositada no Herbário CSTR (Autor, 2016).

3.2.3 Obtenção do Extrato Vegetal

A metodologia utilizada para obtenção do extrato vegetal de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (mastruz), foi baseada no trabalho de Brasileiro *et al.*, (2006).

O referido extrato vegetal foi preparado a partir das partes aéreas (caule, folhas e frutos) de plantas adultas frescas. Após coletadas, foram cortadas em pequenos pedaços com auxílio de tesoura (Figura 12) e em seguida pesadas, totalizando 4870 g.



Figura 12 – Espécie vegetal cortada para pesagem (Autor, 2016).

A planta cortada foi colocada em um percolador de aço inox (Figura 13) a temperatura ambiente (26°C) com etanol a 95% (Figura 14A), e deixada em repouso (Figura 14B) por 72 horas.



Figura 13 – Percolador de aço inox (Autor, 2016).



Figura 14 – Adição do etanol 95% (A) e o vegetal com etanol deixados em repouso (B) (Autor, 2016).

No momento da extração, já era realizada a filtragem, por meio da inserção do algodão na parte inferior do percolador (Figura 15 A), resultando em um líquido de cor verde o qual foi acondicionado em béquer e transferido para balões volumétricos (Figura 15 B).

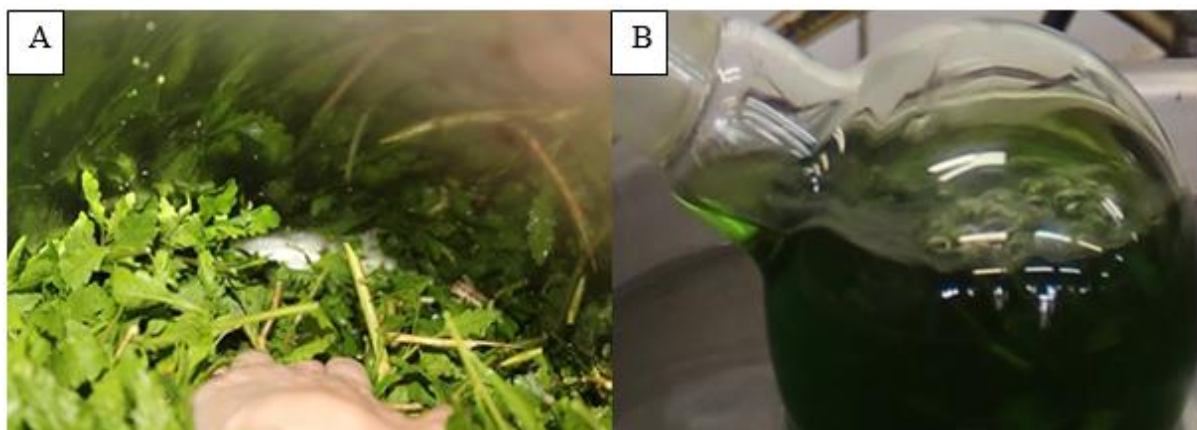


Figura 15 – Algodão colocado dentro do percolador para filtragem (A) e Balão volumétrico com líquido verde resultante (B) (Autor, 2016).

Posteriormente, o filtrado foi colocado em um rota evaporador rotatório R-210 BUCHI, à pressão de 64 Bar com temperatura de 50°C por 48 horas (Figura 16).



Figura 16 – Rota evaporador rotatório utilizado (Autor, 2016).

Ao final dessa etapa, foi obtido 100,7217g de um material escuro, pastoso, denominado extrato alcoólico bruto (EAB) (Figura 17).

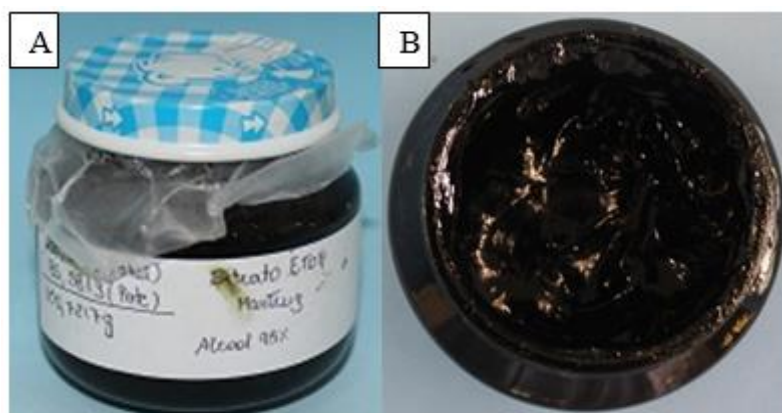


Figura 17 – Recipiente contendo o extrato (A) e imagem superior do recipiente contendo o extrato (B) (Autor, 2016).

3.2.4 Procedimento Fitoquímico: *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants

Após obtenção do EAB, para a caracterização fitoquímica do mesmo, foram realizados testes clássicos de identificação para os principais grupos de princípios ativos: alcalóides (reações de Bouchardat, Mayer, Dragendorff e Ácido Sílico-Tungstico), esteróides, taninos (reação de gelatina a 0,5% e reação com cloreto

férrico a 2%), flavonóides (fita-magnésio e fluorescência) e saponinas (teste de espuma).

3.2.5 Preparação das esferas de quitosana/ *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants e esferas de quitosana (grupo controle)

Nos subtópicos 3.2.5.1 e 3.2.5.2 serão descritas a metodologia para a preparação das esferas de quitosana com o extrato de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants em três diferentes concentrações, bem como das esferas de quitosana, respectivamente.

3.2.5.1 Preparação das esferas de quitosana/ *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants

Todas as etapas para confecção das esferas foram realizadas no CERTBIO - Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG.

Para tanto, foi preparada uma solução de quitosana 2% (m/v) por meio da dissolução de 20g de quitosana em 1 litro de solução de ácido acético glacial a 1% (v/v), no agitador mecânico (IKA® RW 20, digital da marca IKA®) durante 24 h a 435 rpm (Figura 18).

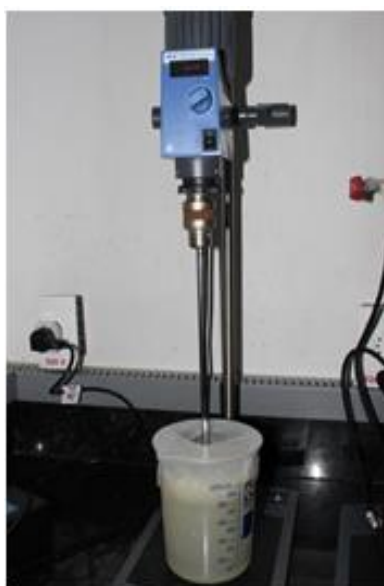


Figura 18 – Preparo da solução de quitosana 2% em ácido acético glacial a 1% sob agitação mecânica (Autor, 2016).

Em seguida foram retiradas porções menores da solução da quitosana às quais foram adicionadas o EAB, resultando 100 mL de cada solução com 5%, 10% e 20% de EAB com relação a massa do polímero empregado.

Para obtenção da solução de quitosana com diferentes percentuais de EAB foram feitos os seguintes cálculos: Se em 1000mL de solução de quitosana à 2% há 20g de quitosana, em 100mL de quitosana à 2% há 2g de quitosana. Sendo assim, para se conseguir 100mL de solução de quitosana à 2% com 5% de extrato do mastruz em relação à massa da quitosana, foi necessário adicionar 0,1g do EAB; para 100mL de uma solução de quitosana à 2% com 10% de extrato em relação a massa da quitosana, foi necessário adicionar 0,2g do EAB e finalmente para obtenção de 100mL de uma solução de quitosana à 2% com 20% de extrato em relação a massa da quitosana, foi necessário adicionar 0,4g do EAB. A Figura 19 apresenta os passos seguidos para a dissolução do EAB na solução de quitosana, onde 19A mostra a pesagem do EAB em balança analítica (Shimadzu AUY220), 19B a incorporação do mesmo na solução de quitosana, para facilitar essa diluição foi colocado uma pequena quantidade da solução de quitosana sobre o vidro relógio no qual o EAB foi pesado, antes de adicioná-lo ao volume total da solução de quitosana e 19C a mistura do EAB na solução de quitosana sob agitação mecânica (IKA® RW 20, digital da marca IKA®) por 30 minutos a 435 rpm.

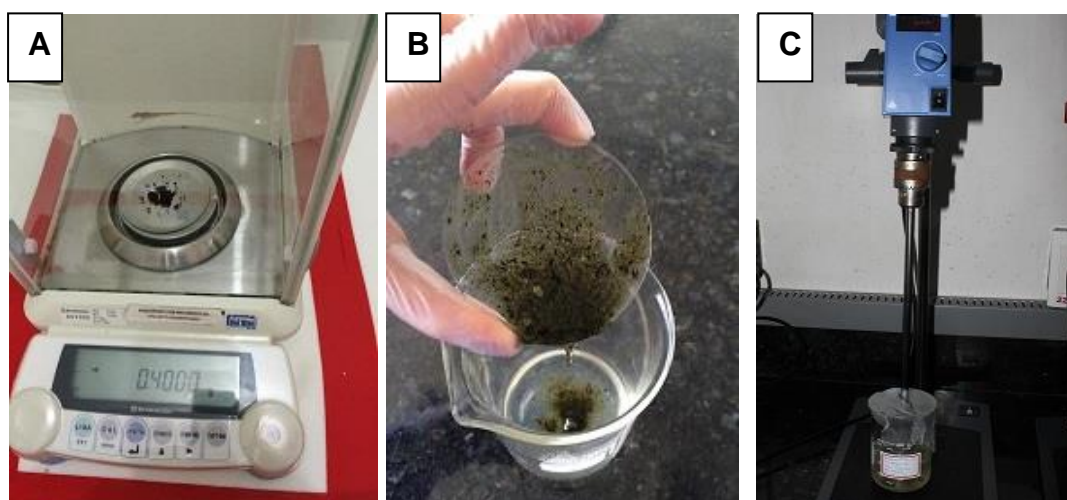


Figura 19 – Dissolução do extrato do mastruz. (A) Pesagem do EAB, (B) Incorporação do EAB na solução de quitosana e (C) Mistura do EAB na solução de quitosana sob agitação mecânica (Autor, 2016).

A seleção das concentrações do extrato alcóolico bruto (EAB) de *Chenopodium ambrosioides* L., se baseou no trabalho de Pereira (2009), no qual

concluíram que a dose terapêutica de 5mg/Kg apresentou ação anti-inflamatória tanto para inflamação aguda como crônica e não apresentou toxicidade. Baseado nisso, na pesquisa atual foi considerado que um adulto com 70 kg poderá receber 350mg do extrato de *Chenopodium ambrosioides* L.

A partir dessa informação, foram feitos outros cálculos; primeiramente foi avaliado quantas esferas de quitosana se produziu com 10 mL da solução quitosana a 2%, usando uma seringa (Descarpack) /agulha(NIPRO 25x0.8mm) acoplada à uma bomba de infusão (Cole Parmer) com velocidade de 20mL/h, o resultado obtido foi 476 esferas. Então, sabendo que em 10 mL da solução de quitosana 2% com 5% de EAB, tem 10 mg de EAB e que cada gota que irá formar uma esfera, terá aproximadamente 0,02mg de EAB. Se for considerado um adulto de 70 kg o mesmo poderá receber 17.500 esferas na concentração de 5% de EAB, na concentração de 10% de EAB o mesmo adulto poderá receber 8.750 esferas e na concentração de 20% de EAB este poderá receber 4.375 esferas. Como as esferas são muito pequenas optou-se por essas concentrações do EAB para possibilitar a utilização de quantidades maiores, em se tratando de regiões anatômicas extensas; assim como também em pacientes com peso reduzido.

Posteriormente às diluições, foi utilizada a técnica de Geleificação Ionotrópica. Para tanto, foram adicionados separadamente, 10 mL de cada solução (5%, 10% e 20% de EAB) em seringas de 10mL (Descarpack) equipadas com uma agulha de 25 milímetros de comprimento e 0,80 milímetros de diâmetro (NIPRO). O conjunto (seringa/agulha/solução) foi então acoplado a uma bomba de infusão (Cole Parmer) com velocidade de 20 mL/h (Figura 20 A). As gotículas formadas (Figura 20 B) foram recolhidas em um béquer contendo 100mL de solução de TPP (Tripolifosfato de Sódio) a 5%, onde foram formadas as esferas (Figura 21 A). As mesmas permaneceram na solução de TPP por 30 minutos (Figura 21 B).

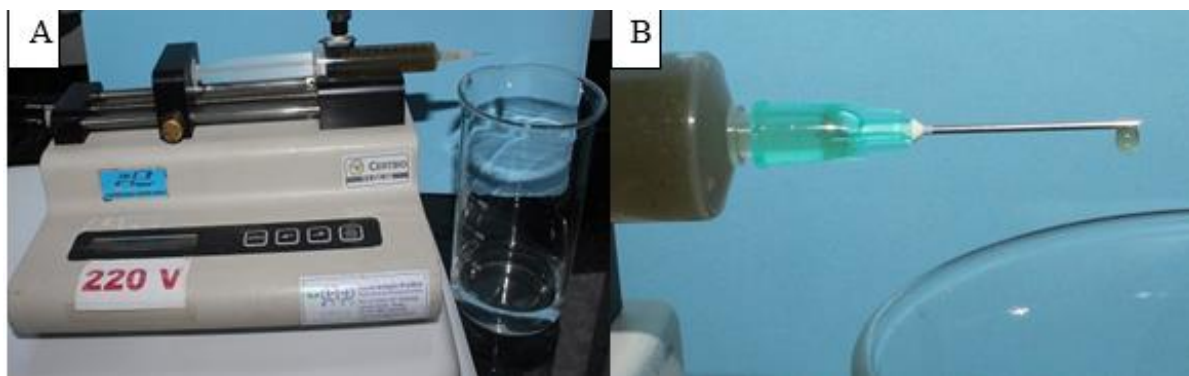


Figura 20 – Conjunto (seringa/agulha/solução) acoplado a bomba de infusão (A) e Formação da gotícula (B) (Autor, 2016).

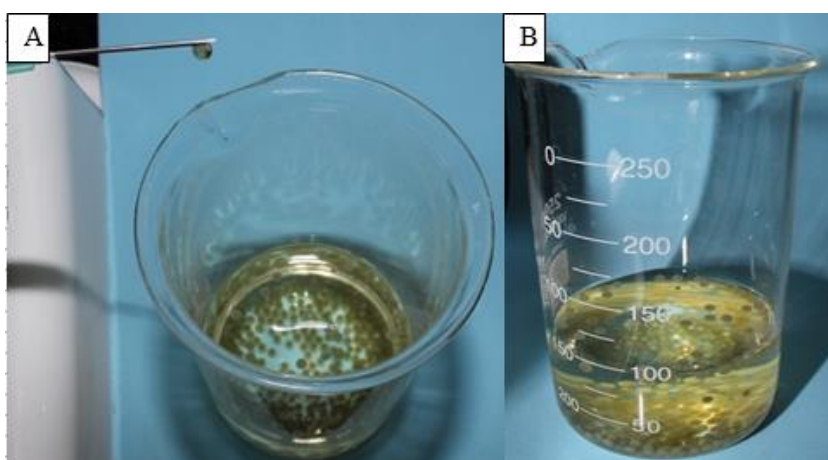


Figura 21 – Formação das esferas (A) e Esferas em repouso na solução de TPP 5% (B) (Autor, 2016).

Decorrido esse tempo, as esferas foram lavadas em 10mL de água destilada, permanecendo imersas por cinco minutos (Figura 22 A), depois foram despejadas em uma peneira (Figura 22 B). Esse processo de lavagem foi realizado por mais duas vezes, totalizando três ciclos para cada um dos grupos.

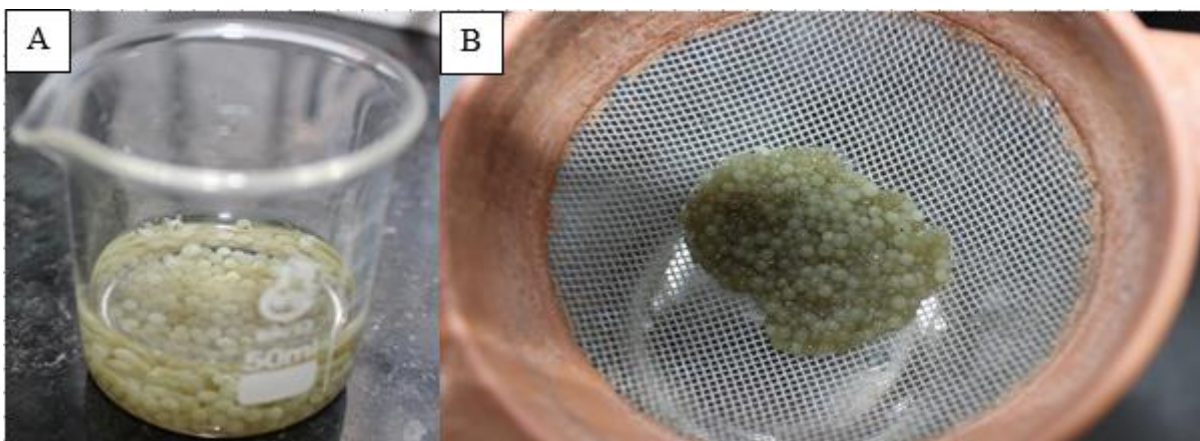


Figura 22 – Lavagem das esferas com água (A) e Esferas na peneira (B) (Autor, 2016).

Concluído o terceiro ciclo de lavagem, as esferas de quitosana/ *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants foram dispostas em discos de papel filtro para remover o excesso de água (Figura 23A) e levadas a estufa microprocessada para cultura bacteriológica (Sterilifer) por 24 horas a 37°C para secar (Figura 23B).

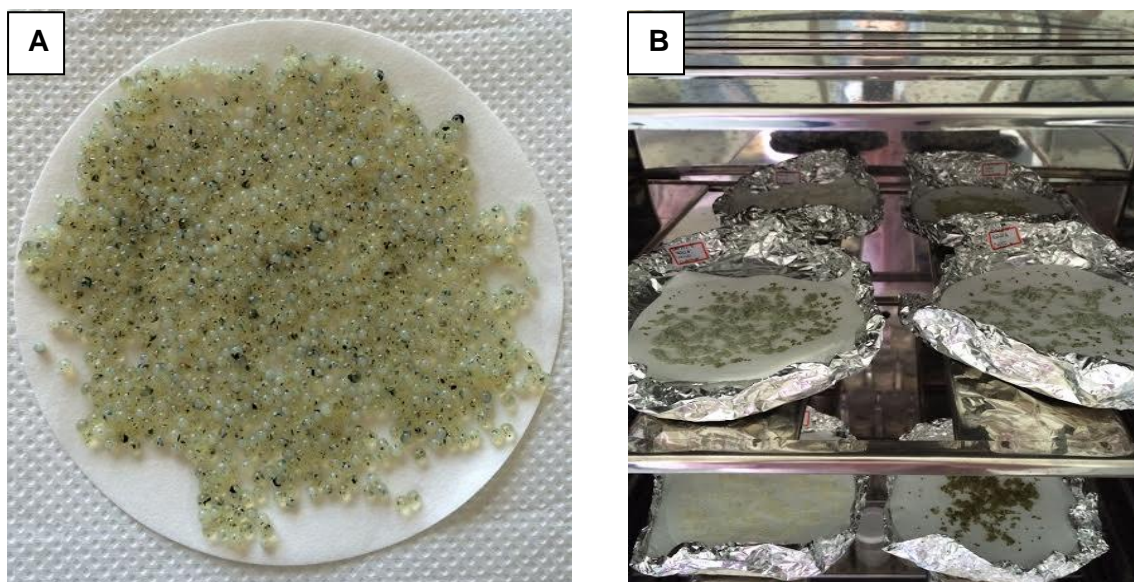


Figura 23 – Esferas de quitosana/ *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants na estufa, dispostas em discos de papel filtro (A) e os mesmos na estufa (B) (Autor, 2016).

Passadas as 24 horas, as esferas foram acondicionadas, separadamente por grupo, em os tubos falcon (Figura 24A) e finalmente, organizadas em eppendorf para que serem encaminhadas para as caracterizações (Figura 24B).

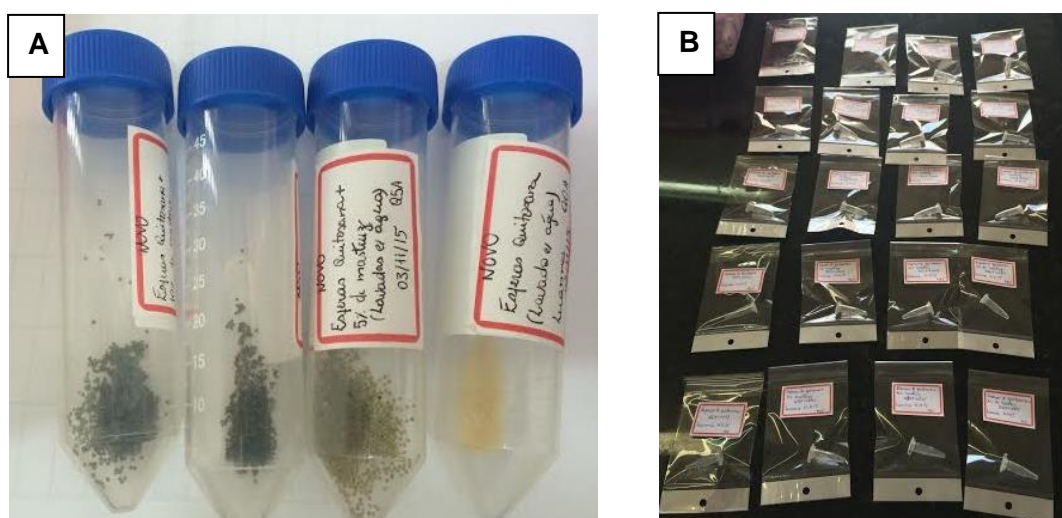


Figura 24 – Amostras acondicionadas por grupo em tubos falcon (A) e amostras organizadas em eppendorf e identificadas (B) (Autor, 2016).

3.2.5.2 Preparação das esferas de Quitosana

Para a preparação das esferas de quitosana, seguiu-se as mesmas etapas utilizadas para a confecção das esferas de Quitosana/ *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, exceto a adição do extrato alcoólico do mastruz. A Tabela 2 demonstra a identificação dos grupos formados para pesquisa.

Tabela 2 – Identificação dos grupos formados.

| Esferas | Grupos |
|------------------------|---------------|
| Quitosana | Q0 |
| Quitosana + 5% de EAB | Q5 |
| Quitosana + 10% de EAB | Q10 |
| Quitosana + 20% de EAB | Q20 |

3.2.6 Técnicas de caracterização

As esferas de quitosana (Q0) e quitosana com o extrato de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants em diferentes concentrações (Q5, Q10 e Q20), foram caracterizadas pelas técnicas de Microscopia Óptica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), pela medida do diâmetro das esferas e pelos ensaios de Citotoxicidade *in vitro*, Biodegradação Enzimática *in vitro* e Compressão (Figura 25). Todas as caracterizações foram realizadas no CERTBIO - Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG.

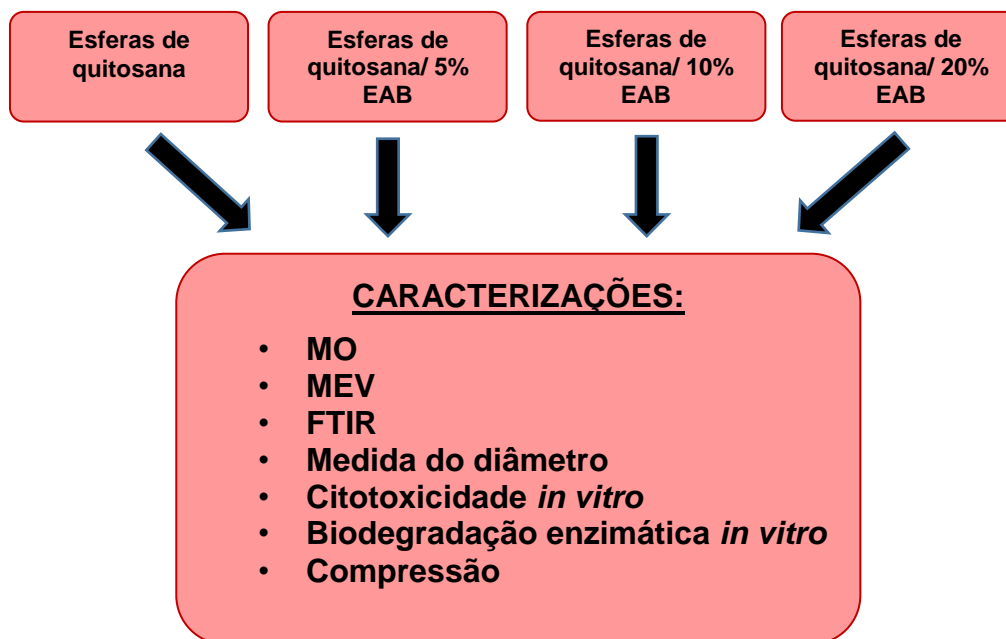


Figura 25 – Fluxograma com as caracterizações realizadas. (Autor, 2016).

3.2.6.1 Microscopia Óptica (MO)

A Microscopia Ótica é utilizada frequentemente, possibilitando análises microestruturais, servindo geralmente como ponto de referência para a microscopia eletrônica (Aparecida, 2006).

Para caracterização por microscopia ótica das esferas de quitosana sem e com o extrato *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants em diferentes concentrações, foi utilizado um Microscópio Ótico da marca Hirox, modelo (SHX-13M).

Foram realizadas imagens da superfície externa das esferas com o aumento de 40X e 100X, bem como da superfície transversal de corte utilizando-se o aumento de 160X; estas últimas superfícies foram obtidas a partir do corte das esferas em duas partes, para tanto foi utilizada uma lâmina de bisturi nº 15C (Solidor) (Figura 26).



Figura 26 – Corte da esfera com uma lâmina de bisturi (Autor, 2016).

3.2.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permite observar e caracterizar materiais, a partir da emissão e interação de feixes de elétrons sobre uma amostra, sendo possível caracterizá-los do ponto de vista de sua morfologia e sua organização ultra-estrutural. A microscopia eletrônica analisa o material por meio da irradiação por um fino feixe de elétrons que interage com a superfície da amostra e origina uma série de radiações. Estas radiações quando captadas corretamente irão fornecer características sobre a amostra (topografia da superfície, composição, cristalografia) (Fook, 2005).

Para esse ensaio, foram realizadas imagens da superfície externa das esferas com os aumentos de 1000X, como também da superfície interna transversal de corte com aumentos de 180 e 2000X; estas últimas superfícies foram obtidas a partir do corte das esferas em duas partes, conforme descrito anteriormente na sessão de Microscopia Ótica.

Para caracterização por MEV, foi empregado o equipamento modelo TM-1000 da marca Hitachi. Os parâmetros utilizados foram: profundidade de foco de 1mm, resolução de 30nm, 15KV, baixo vácuo, sem recobrimento metálico mesmo em amostras não condutoras (Fook, 2012).

3.2.6.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR foi realizada para caracterizar os materiais utilizados, tais como; quitosana, o EAB (Extrato alcólico bruto de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants) e o tripolifosfato de sódio (TPP), bem como as esferas de quitosana com e sem a adição do EAB. Esta caracterização foi realizada em um espectrômetro modelo Spectrum 400 da Perkin Elmer e teve como objetivo identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nas matérias primas utilizadas e nos produtos finais obtidos nesta pesquisa, utilizando a faixa de varredura de 4000 a 600 cm^{-1} , descrita na literatura (Fook, 2012).

No presente trabalho, para se conseguir realizar a caracterização por meio do FTIR, foi preciso triturar as esferas manualmente, com o auxílio de um cabo de um espelho clínico odontológico (Figura 27); uma vez que a ponteira do equipamento espalhava as esferas caso fossem colocadas inteiras, impossibilitando o ensaio (Figura 28).



Figura 27 – Processo de trituração das esferas para o FTIR. Esferas inteiras (A), Trituração das mesmas com odontoscópio (B) e aspecto final das esferas após trituração (Autor, 2016).

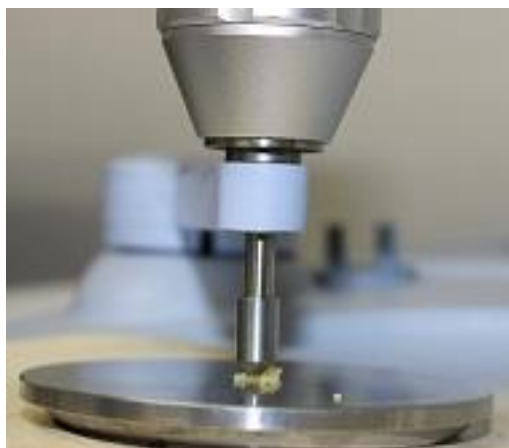


Figura 28 – Ponteira do FTIR espalhando as esferas inteiras. Esferas inteiras (A), Trituração das mesmas com odontoscópio (B) e aspecto final das esferas após trituração (Autor, 2016).

3.2.6.4 Medida do diâmetro das esferas

Foi medido diâmetro de cinco esferas de cada um dos grupos (Q0, Q5, Q10 e Q20) por meio de um micrômetro (Mitutoyo 0-25mm); tanto das esferas úmidas quanto de esferas após secagem na estufa. Para a medição das esferas úmidas, seguiu-se o seguinte protocolo, após o terceiro ciclo de lavagem as mesmas foram deixadas ao ar livre sobre um papel filtro por 30 minutos para a remoção do excesso de umidade; já para as esferas secas, ou seja, desidratadas na estufa, as mesmas foram medidas 24 horas após sua remoção da estufa e durante este tempo ficaram acondicionadas em tubos falcon fechados.

3.2.6.5 Ensaios de citotoxicidade *in vitro*

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993-5:2009, o teste de citotoxicidade *in vitro* é um teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos (Rogero *et al.*, 2003). Este ensaio objetiva avaliar o potencial quantitativo de citotoxicidade de um material, ou seja, a capacidade que um material tem em produzir efeitos letais ou subletais em sistemas biológicos ao nível celular.

Na presente pesquisa, o ensaio de citotoxicidade foi realizado, por meio do contato direto entre as esferas e as linhagens de fibroblastos (L929). Para tanto, foi utilizada uma concentração de 5×10^5 células/mL do meio para cultivo de células tipo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640-C e adicionados 100 μ L em uma placa de 96 poços. A placa foi transferida para a estufa de CO₂ (5%) a 37 °C por 1 hora. Após este período, foram adicionadas as amostras e mais 200 μ L de RPMI 1640-C, foram usados 12 poços para cada grupo testado (totalizando 48 poços), 12 poços para o branco e 12 poços para o controle negativo, o RPMI 1640-C foi utilizado como controle. A placa foi incubada novamente em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 24 horas. Após as 24 horas, foram adicionados 100 μ L de solução de Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) em RPMI 1640-C (0,5mg/mL). Novamente, a placa foi incubada em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 3 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μ L de álcool isopropílico. Finalmente, foi realizada a leitura da densidade ótica em um leitor de microplacas (Victor 3 – PerkinElmer), a 540 nm com filtro de referência de 620 nm. A

viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando o controle negativo com 100% de viabilidade.

O teste de MTT tem como finalidade a determinação do número de células viáveis em estudos citotóxicos, já que estabelece uma correlação entre a atividade metabólica celular e o número de células viáveis em cultura *in vitro*. Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de formazan de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Sendo a endocitose um mecanismo essencial das células vivas, o ensaio do MTT tem sido frequentemente empregado como ensaio de viabilidade celular. Por ser relativamente seguro para o operador, rápido, sensível e reprodutível, o teste de MTT surgiu como uma alternativa, tendo-se tornado um popular método de rastreamento para a citotoxicidade de vários compostos (Stoddart, 2011).

De acordo com a classificação de citotoxicidade de materiais do documento ISO 10993-5: 2009, a viabilidade celular (%) determina a citotoxicidade do material; de modo que se o percentual de viabilidade celular for > 70 , o material é considerado como não-citotóxico.

3.2.6.6 Ensaio de Biodegradação Enzimática *in vitro*

Este ensaio foi realizado com base nas normas da American Society for Testing and Materials (ASTM) F1635-04 Standard Test Method for *in vitro* Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants (2009) e a ASTM F2103-01 Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Products Applications (2007).

Para tanto, esferas inteiras de cada um dos grupos (Q0, Q5, Q10, Q20) foram submetidas a avaliação da biodegradação em solução de Phosphate Buffered Saline (PBS) e outras amostras, também de cada um dos quatros grupos, foram submetidas a avaliação da biodegradação em solução de lisozima/PBS com concentração de 1 mg/mL.

Foram utilizadas 50mg (± 2 mg) de esferas, correspondendo a massa inicial de cada amostra. Para cada grupo (Q0, Q5, Q10, Q20) foram realizadas o ensaio em

três amostras, tanto para a solução de PBS, quanto para a solução de lisozima/PBS; para cada um dos tempos determinados; 7, 14 e 21 dias.

As amostras foram incubadas em estufa microbiológica, à temperatura de 37°C. As primeiras esferas de cada grupo (triplicata), tanto do PBS quanto da lisozima/PBS foram retiradas da estufa após 7 dias; as outras esferas de cada grupo (triplicata) mantidas no PBS e lisozima/PBS só foram retiradas da estufa após 14 dias e 21 dias.

Depois da remoção das esferas da estufa em cada um dos tempos propostos, procedeu-se a pesagem em balança analítica (Shimadzu AUY220). Ressaltando-se que as soluções de PBS e lisozima/PBS foram trocadas a cada 7 dias para os tempos de 14 e 21 dias. Os valores das massas das amostras antes e após os tempos determinados, forneceram os resultados referentes à degradação das esferas, observados a partir da média de ensaios repetidos. Os dados foram anotados em uma planilha.

3.2.6.7 Ensaio de Compressão

O ensaio de compressão foi realizado para avaliar as propriedades mecânicas das esferas com a finalidade de observar como estas irão reagir quando comprimidas e verificar a carga máxima suportada por elas. O ensaio de compressão foi adaptado de Fontes (2010) e atribuiu valores específicos para diâmetro de cada uma das amostras e as condições do ensaio. Antes do início do teste, foi realizada uma análise visual direta dos espécimes, com a finalidade de verificar a sua integridade. Os testes de compressão foram efetivados pela ação de uma carga axial compressiva em uma máquina Universal de ensaios mecânicos da marca Instron, modelo 3366, com uma célula de carga de 500N e taxa de deformação constante de 0,5 mm/min. Três amostras de cada grupo foram testadas e se utilizou para avaliação os valores de Máxima Carga Compressiva e Deformação compressiva em máxima carga compressiva.

3.2.7 Análise estatística

Os resultados da medida do diâmetro das esferas, do ensaio de Biodegradação Enzimática *in vitro* e do ensaio de compressão foram tabulados e analisados estatisticamente no programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS v. 20, IBM, Chicago, IL), sendo considerado o nível de significância de 5% ($\alpha < 0,05$). Inicialmente, os dados foram analisados quanto a sua distribuição, sendo aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Dada a distribuição normal, os dados foram analisados segundo análise de variância (ANOVA).

Em relação à análise do diâmetro das esferas, foram considerados os fatores “concentração do extrato de mastruz” e “hidratação das esferas”. Desse modo, realizou-se a análise de variância a dois critérios fixos (two-way ANOVA), utilizando-se o teste de Tukey HSD (honestly significant difference) para diferenças pós-teste intergrupos.

Para a análise de biodegradação enzimática *in vitro*, foram considerados os fatores “concentração do extrato de mastruz”, “tempo” e “presença de lisozima”. Assim, foi realizada a análise de variância a três critérios fixos (three-way ANOVA). Para análise das diferenças intergrupos, utilizou-se o teste de Tukey HSD.

Por fim, quanto à análise de compressão das amostras, a concentração do extrato de mastruz das esferas foi considerada como único fator de estudo. Realizou-se então a análise de variância a um critério fixo (one-way ANOVA), utilizando-se o teste de Tukey HSD para diferenças pós-teste intergrupos.

Os resultados foram expressos em gráficos e em tabelas, sendo consideradas as medidas de média e desvio-padrão, considerando-se o nível de confiança de 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos subtópicos a seguir serão demonstrados os resultados e a discussão para o procedimento fitoquímico do EAB, bem como para cada uma das técnicas de caracterizações utilizadas na pesquisa, cabe salientar que todas as caracterizações foram realizadas com as esferas após a secagem na estufa, exceto a medição do diâmetro, que foi realizada com as mesmas ainda úmidas e também após o processo de secagem.

4.1 Procedimento Fitoquímico: *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants

Na análise fitoquímica do extrato etanólico de *Dysphania ambrosioides* foi encontrado a presença de esteróides, saponinas e principalmente flavonóides (Apêndice A).

No estudo de Pereira *et al.* (2015), foi realizada o procedimento de análise fitoquímica do extrato metanólico de *Chenopodium ambrosioides* L., neste foram identificados os compostos: taninos pirogálicos, taninos flobabênicos, flavonas, xantonas, chalconas, auronas, leucoantocianidinas, catequinas, flavononas.

Aos flavonóides, encontrados em maior quantidade nesta pesquisa, é associada a resposta antimicrobiana, com capacidade de formar complexos com proteínas solúveis extracelulares que se ligam na parede celular da bactéria (Rauh, 2008). Diversas análises comprovam que compostos flavonóides: flavononas, flavononóis, flavonóis e também os bioflavonóides (xantonas), exercem atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (Zuanazzi e Montanha, 2004; Sá *et al.*, 2012).

4.2 Técnicas de caracterização

Nos subtópico a seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos por meio das técnicas de caracterização utilizadas.

4.2.1 Microscopia Óptica (MO)

4.2.1.1 Superfície externa

A Figura 29 ilustra a superfície externa das esferas utilizando-se um aumento de 40X no MO, na qual se observa que as esferas são bem delimitadas; e que se tornaram mais escuras, à medida que o percentual do extrato de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants foi aumentado, evidenciando a incorporação deste.

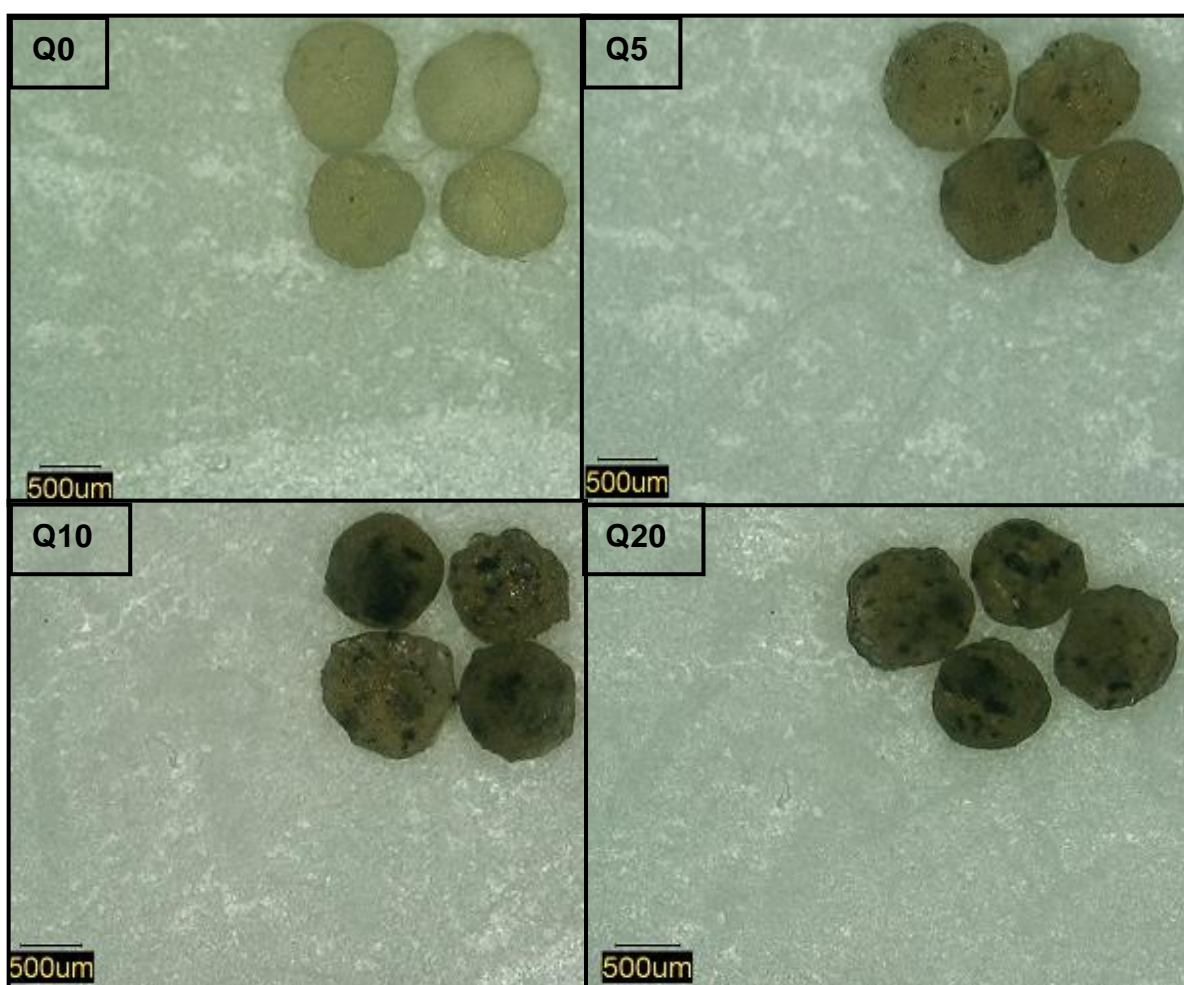


Figura 29 – Imagens das esferas no MO com aumento de 40X. (Q0) Esferas de quitosana, (Q5) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10) Esferas quitosana +10% EAB e (Q20) Esferas quitosana +20% EAB (Autor, 2016).

As imagens das esferas com o aumento de 100X no MO confirma o que foi relatado anteriormente com relação a delimitação e a cor e ainda evidencia áreas verde escuras nas esferas pertencentes aos grupos Q5, Q10 e Q20, sugestivas do extrato não dissolvido (Figura 30).

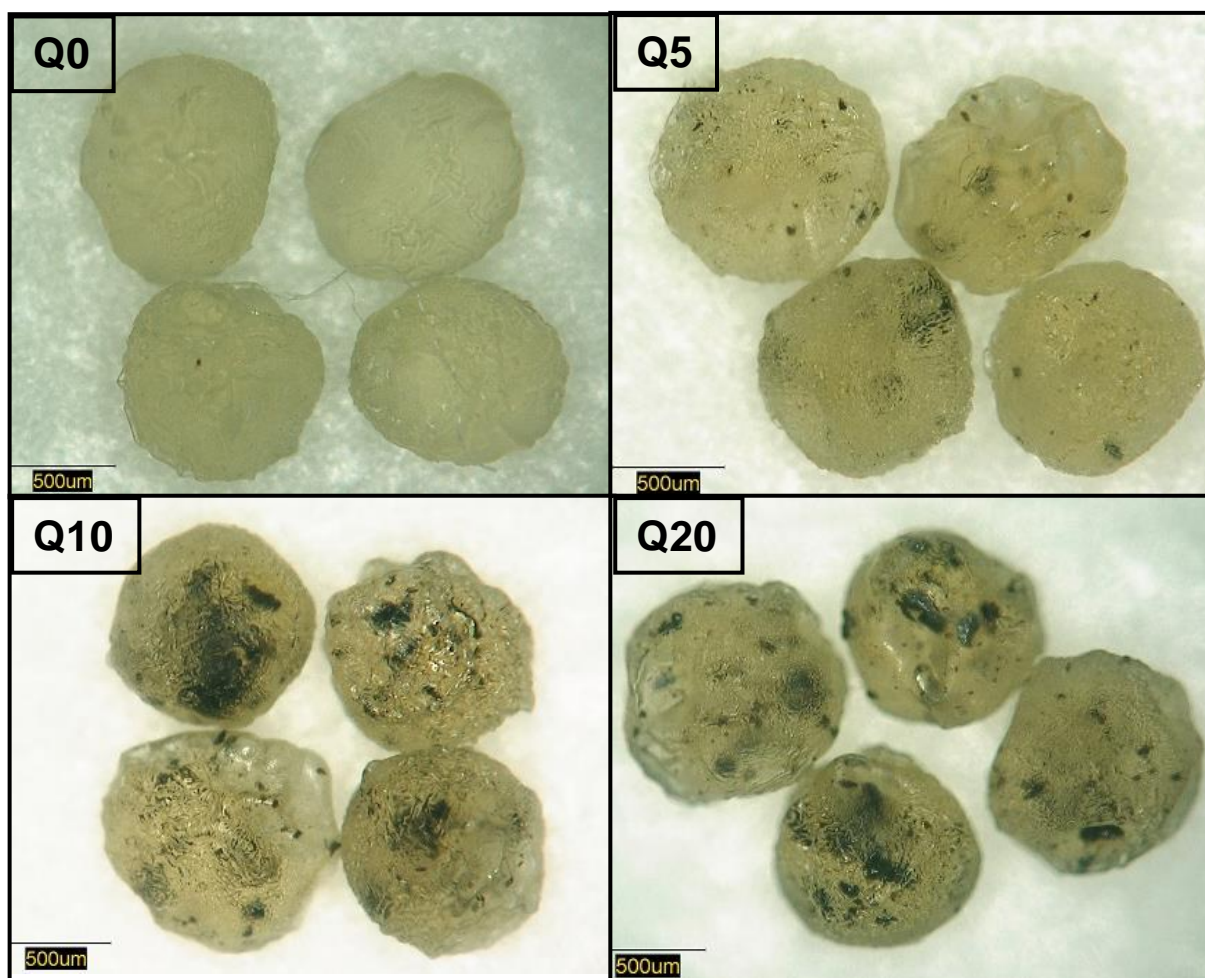


Figura 30 – Imagens das esferas no MO com aumento de 100X. (Q0) Esferas de quitosana, (Q5) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10) Esferas quitosana +10% EAB e (Q20) Esferas quitosana +20% EAB (Autor, 2016).

Trabalhando com esferas de quitosana com albumina de soro bovino (BSA), Ma e Liu (2010), observaram que a eficiência de encapsulação diminuiu com o aumento da proporção de BSA com relação à quitosana. Sendo eficiência de encapsulação inferior a 40% quando a razão em peso de BSA para quitosana atingiu 20%, com as concentrações de EAB utilizadas no presente trabalho não se observou, por meio do MO, perda na eficiência de encapsulação.

De acordo com Bitencourt (2013), a incorporação de substâncias ativas pode influenciar a estrutura superficial e interna dos materiais devido a diversos fatores como, tamanho, peso molecular, interações com a matriz polimérica, dentre outros.

4.2.1.2 Superfície interna

A Figura 31 ilustra a superfície interna das esferas, obtidas por meio do corte das mesmas, utilizando-se no MO um aumento de 160X, nela é possível observar também que as esferas se tornaram mais escuras à medida que o percentual do extrato de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants foi aumentado. Destacam-se nessas imagens, aglomerados do EAB de diversos tamanhos que denotam que o mesmo não foi dissolvido de maneira uniforme.

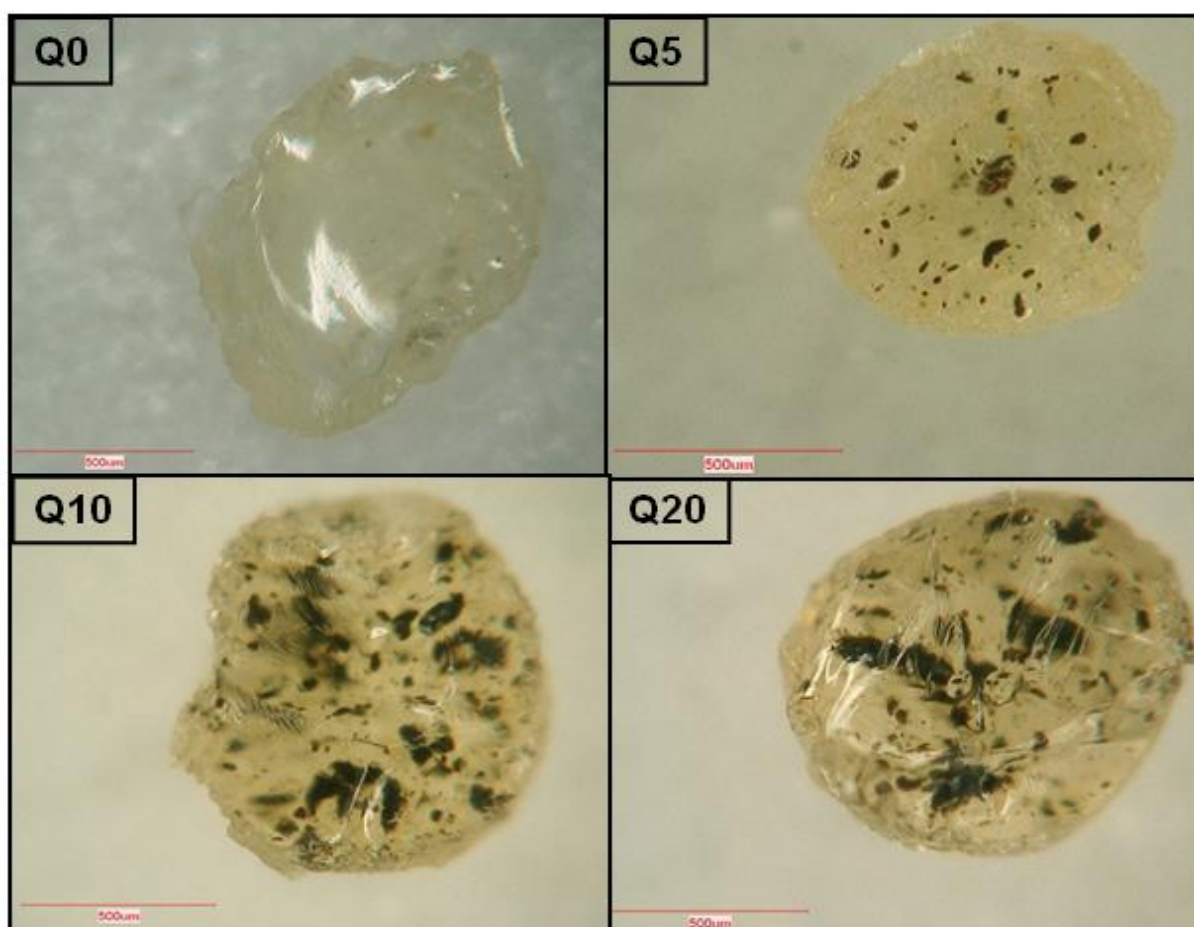


Figura 31 – Imagens da superfície interna no MO com aumento de 160X. (Q0) Esferas de quitosana, (Q5) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10) Esferas quitosana +10% EAB e (Q20) Esferas quitosana +20% EAB (Autor, 2016).

Fernandes (2009b) observou, por meio da microscopia ótica, que membranas de quitosana reticuladas com tripolifosfato de sódio (TPP) 1% por 3 horas exibiram superfícies lisas, com a presença de precipitados, supostamente do TPP. No presente estudo, apesar de ter sido realizado com esferas, seguiu-se um procedimento de secagem parecido com o que ocorre para a formação de

membranas, esse fato pode ter sido responsável pela formação de uma superfície interna densa. Neste, porém, não se observou a presença de precipitados provenientes do TPP, o que pode ser justificado pelo processo de lavagem com água destilada a que foram submetidas as esferas, bem como ao menor tempo de reticulação, visto que as esferas permaneceram apenas 30 minutos no TPP.

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

4.2.2.1 Superfície externa

Foram realizadas imagens (Figura 32) da superfície externa das esferas com o MEV utilizando o aumento 1000X.

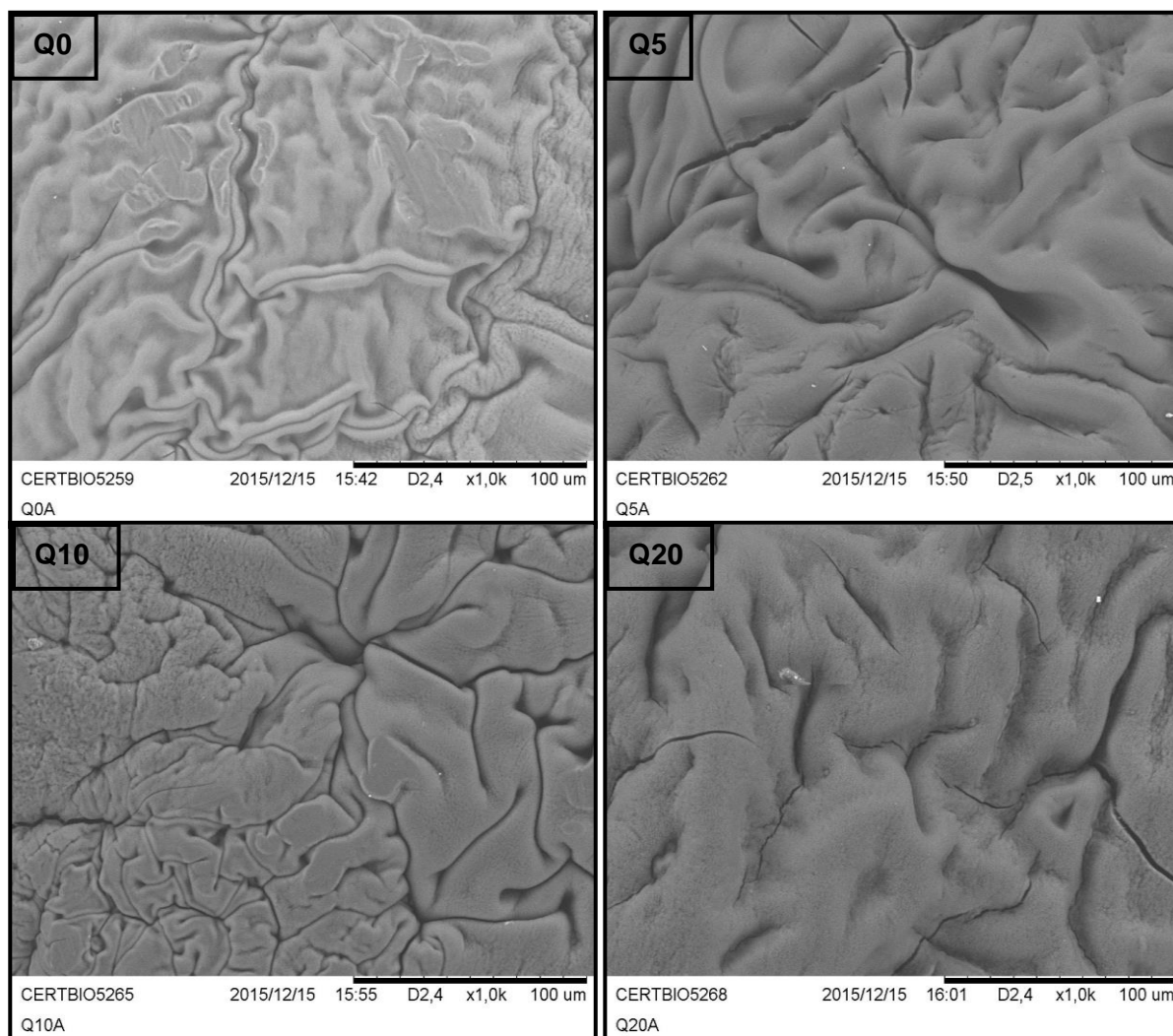


Figura 32 – Imagens do MEV com aumento de 1000X. (Q0) Esferas de quitosana, (Q5) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10) Esferas quitosana +10% EAB e (Q20) Esferas quitosana +20% EAB (Autor, 2016).

As micrografias denotam que a medida que se aumentou a concentração do EAB diminuiu a invaginação na superfície, isto é, ela encolheu menos após a secagem. Tal fato pode decorrer da presença de uma maior quantidade de poros nas esferas de quitosana sem o extrato, visto que com mais poros há mais espaço vazios para serem preenchidos à medida que foi feita a secagem das esferas na estufa. Essa maior quantidade de poros pode estar relacionada a uma menor reticulação nas esferas do grupo Q0.

Torres et al., (2014), estudaram esferas de quitosana para aplicação como suporte de enzimas, quanto à morfologia por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para a produção de tais esferas, os autores utilizaram o NaOH como agente de coagulação. Metade delas foram ainda reticulada com glutaraldeído 2,5% e a outra metade não, em seguida todas foram secas a temperatura ambiente. Estes autores concluíram que as esferas sem reticulação no glutaraldeído apresentaram rugosidade em sua superfície, enquanto as reticuladas houve uma alteração significativa na superfície tornando-as mais uniformes. O que corrobora com os resultados do presente trabalho, no qual o EAB está associado a uma maior reticulação das esferas, tornando-as também mais uniformes.

4.2.2.2 Superfície interna

O corte transversal das esferas possibilitou a visualização da porção interna. A Figura 33, mostra micrografias da superfície interna com o aumento de 180X, onde se pode identificar um aspecto de densidade das esferas, ocasionado pelo processo de secagem na estufa, pode-se ainda observar uma maior rugosidade na superfície externa da esfera quitosana (Q0) quando comparada com as demais.

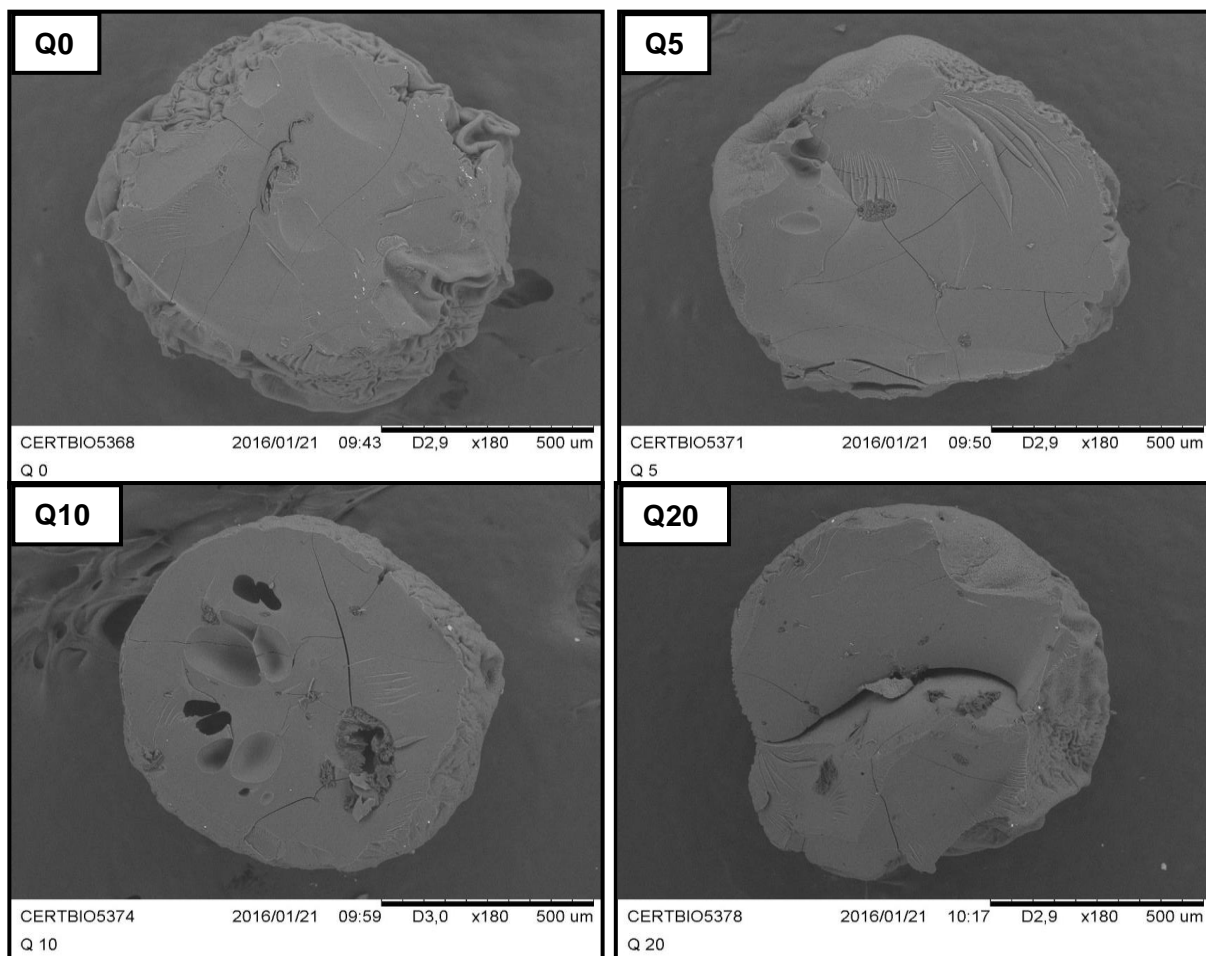


Figura 33 – Imagens do MEV com aumento de 180X. (Q0) Esferas de quitosana, (Q5) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10) Esferas quitosana+10% EAB e (Q20) Esferas quitosana+20% EAB (Autor, 2016).

A Figura 34, mostra micrografias da superfície interna com o aumento de 2000X, onde se pode comprovar que se trata de um material denso, sem a presença de poros, decorrente do processo de secagem, que teve como intuito retirar a umidade e também diminuir o tamanho das esferas.

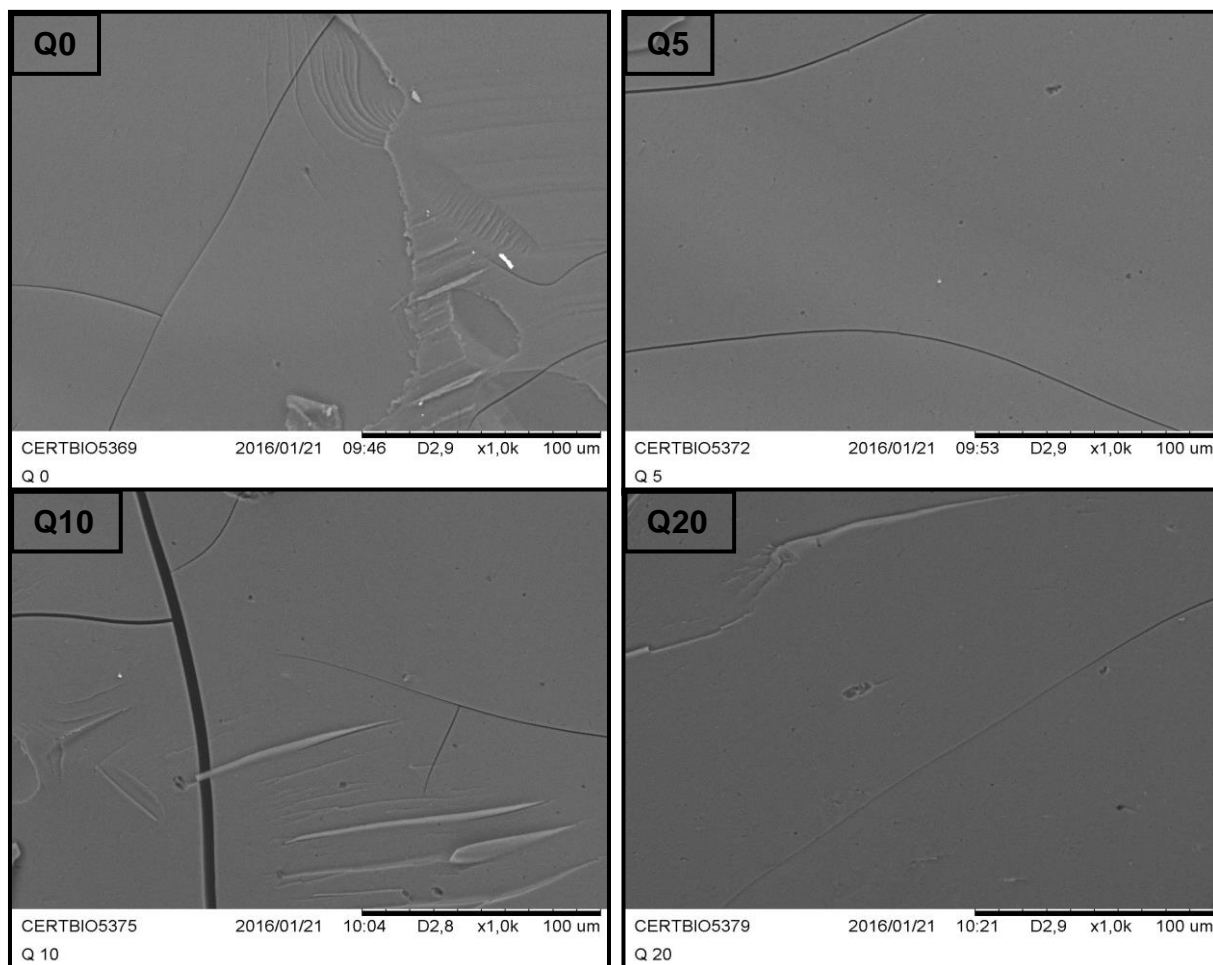


Figura 34 – Imagens do MEV com aumento de 2000X. (Q0A) Esferas de quitosana, (Q5A) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10A) Esferas quitosana +10% EAB e (Q20A) Esferas quitosana +20% EAB, todas lavadas com água (Autor, 2016).

Fidéles (2010), Lima (2010) e Holanda (2011) estudaram a morfologia de filmes de quitosana por meio da microscopia eletrônica de varredura e encontraram uma superfície densa. Como relatado anteriormente, apesar da atual pesquisa ter sido desenvolvida com esferas de quitosana e não com filmes, provavelmente o processo de secagem na estufa, tornou a superfície interna das mesmas densa, semelhantes ao que ocorre nos filmes de quitosana.

Outros autores observaram a presença de poros intercomunicantes em estruturas tridimensionais de quitosana, porém nesses casos foram realizados o processo de congelamento e liofilização (Fávere e Laranjeira, 2009; Fook, 2012 e Cruz 2015).

Sendo assim, com o intuito de observar se havia presença de poros nas esferas produzidas no atual trabalho quando não submetidas ao processo de secagem, procedeu-se a metodologia de congelamento e liofilização das amostras

em substituição a secagem na estufa. As micrografias a seguir, do corte transversal dessas amostras, com o aumento de 2000X (Figura 35), confirmam a presença de poros intercomunicantes e na micrografia Q20, nota-se uma maior densidade da estrutura, decorrente de uma maior reticulação da mesma. Confirmando a idéia de que o EAB atuou como um agente de reticulação. Essa metodologia demonstrou que é possível obter esferas com diferentes apresentações, ou seja, densa e também porosa.

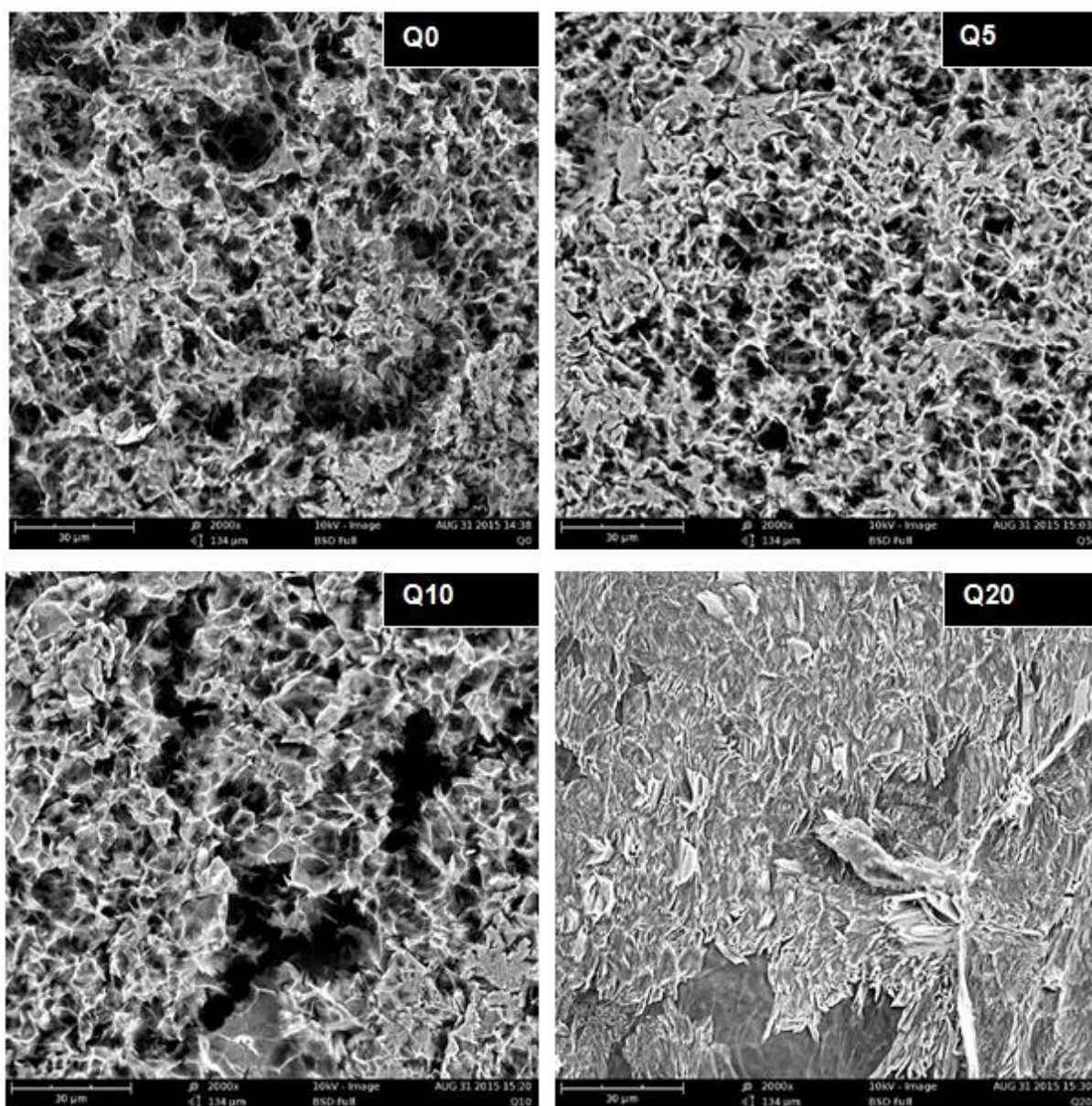


Figura 35 – Imagens do MEV com aumento de 2000X. (Q0) Esferas de quitosana, (Q5) Esferas quitosana +5% EAB, (Q10) Esferas quitosana +10% EAB e (Q20) Esferas quitosana +20% EAB (Autor, 2016).

Uma explicação para o surgimento dos poros é o congelamento da água presente em cada esfera, ocorrendo difusão de moléculas de água e agregação em cristais que depois de sublimados na liofilização deixam o espaço vazio observado como poro (Oliveira, 2015).

O tamanho e a forma do poro afetam a capacidade de fixação e de crescimento das células e, portanto, influencia a regeneração de tecidos em biomateriais com finalidade osteocondutora, o que não foi o objetivo do presente estudo, visto que se buscou, a princípio, um biomaterial com propriedades osteoindutoras, provenientes da biodegradação dos seus componentes. Segundo Cheung *et al.* (2007), para materiais osteocondutores o tamanho e geometria ideal dos poros são dependentes de tipos específicos de células. No caso do tecido ósseo, o tamanho ótimo para o crescimento celular varia de 75-250 μm , enquanto que para tecido fibro-cartilaginoso, o tamanho deve ser maior, estando em torno de 200-300 μm .

4.2.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 36 observa-se o espectro de infravermelho obtido do pó da quitosana, onde foram encontrados os grupos funcionais típico da mesma. A banda de absorção em torno de 3350 cm^{-1} referente ao alongamento vibracional da ligação -NH e, quase sobreposta, há uma contribuição de estiramento do grupo -OH na faixa 3260 cm^{-1} . As bandas em 2922 cm^{-1} e 2880 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramentos dos grupos C-H assimétrico (CH_2) e simétrico (CH_3), respectivamente. Na região de 1670 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} pode ser observada uma absorção atribuída ao estiramento C=O de amidas; e a banda em 1542 cm^{-1} referente à vibração de estiramento da ligação -NH da amina protonada (NH_3^+). As bandas em 1406 cm^{-1} e 1379 cm^{-1} são características da vibração de deformação angular simétrica do grupo -CH_3 pertencente ao grupo acetamido. A banda em 1258 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento do grupo -C-O-H . Bandas de absorção na região de 1152 e 1064 cm^{-1} correspondem à vibração de estiramento dos grupos -C-O-C assimétrico e -C-O-C simétrico (Mincheva, *et al.*, 2013; Yuan, *et al.*, 2010).

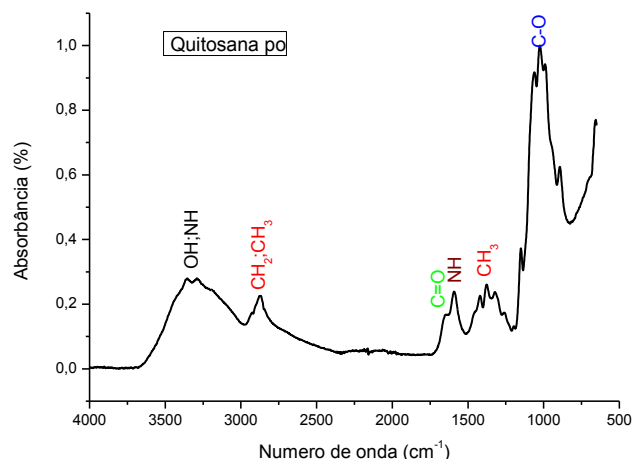


Figura 36 – Espectro na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier da quitosana em pó utilizada (Autor, 2016).

Na Figura 37 é possível visualizar o espectro de infravermelho do extrato alcoólico bruto de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (EAB). Nele se observa a banda de absorção em torno 3260 cm^{-1} correspondente ao estiramento do grupo -OH ; evidencia-se também, em aproximadamente 2800 cm^{-1} , uma banda que pode ser atribuída aos estiramentos C-H simétrico e assimétrico dos grupos metila; na região de 1670 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} pode ser observada uma absorção atribuída ao estiramento C=O de amidas. Ainda é possível detectar as bandas em 1406 cm^{-1} e 1379 cm^{-1} que são características da vibração de deformação angular simétrica do grupo -CH_3 e entre 1250 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} pode ocorrer uma absorção atribuída ao estiramento C-O de álcoois e fenóis.

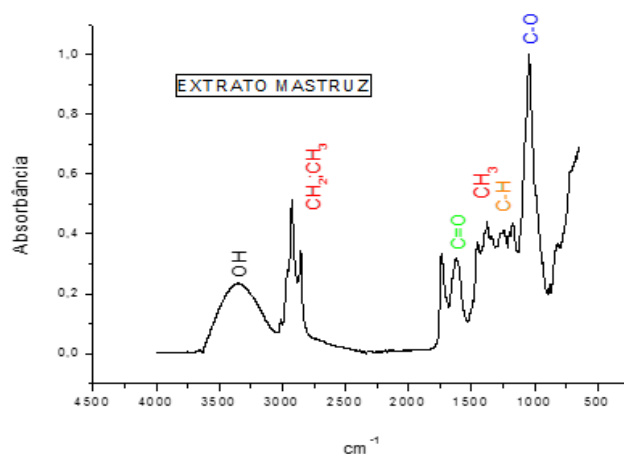


Figura 37 – Espectro na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do extrato alcoólico bruto de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants tripolifosfato (EAB) (Autor, 2016).

Antes de apresentar os espectros das esferas produzidas nesse estudo, será exposto o espectro de infravermelho do tripolifosfato de sódio em pó (Figura 38) usado como reticulante em todas as esferas. No qual se pode observar bandas de alta intensidade em 1125 cm^{-1} relativas ao estiramento simétrico do grupo P=O e em 875 cm^{-1} correspondendo ao estiramento assimétrico P - O - P .

No trabalho de Cruz (2015) a avaliação do espectro do TPP em pó verificou bandas de alta intensidade em 888 cm^{-1} correspondendo ao estiramento assimétrico P - O - P , bandas em 1095 cm^{-1} devido ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo PO_3 , bandas em 1137 cm^{-1} relacionadas aos estiramentos axiais assimétricos e simétricos e do grupo PO_2 , bem como bandas em 1210 cm^{-1} relativas ao estiramento simétrico do grupo P=O , corroborando com os resultados encontrados nesta pesquisa.

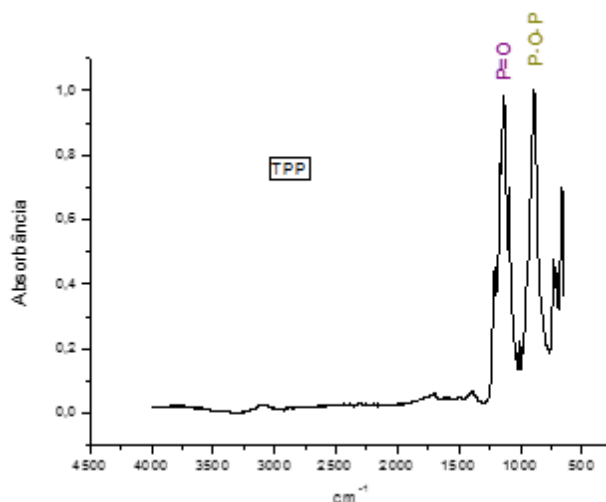


Figura 38 – Espectro na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier do TPP (Autor, 2015).

Lin, Chen e Chen (2007) descreveram que o tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) possui bandas características de absorção para números de onda entre 1200 e 1250 e de 1050 cm^{-1} , os quais representam a presença do grupo P=O e o grupo R-O-P-O , respectivamente.

Durante o processo de trituração manual das esferas para possibilitar a caracterização por meio do FTIR, foi observado que as esferas do grupo Q0 apresentavam maior dificuldade para serem trituradas, enquanto que à medida que se aumentava a concentração do EAB, essa dificuldade diminuía. Tal observação corrobora com os demais achados, os quais demonstram que o EAB atuou como agente reticulante da quitosana, tornando-a mais frágil.

A seguir será apresentado os espectros das esferas dos grupos Q0, Q5, Q10 e Q20 (Figura 39) no intuito de se observar a incorporação do EAB e também do agente reticulante.

Foi possível verificar a presença do TPP, usado como agente de reticulação, nas esferas de todos os grupos (Figura 39) pelo aparecimento da banda em torno de 880 cm^{-1} correspondendo ao estiramento assimétrico P - O - P, típico desse agente reticulante.

Laus, Laranjeira e Martins (2006) observaram que a imersão de membranas de quitosana em uma solução de tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) induz uma reticulação iônica entre os íons tripolifosfato e os grupos amino protonados da quitosana. A reticulação da quitosana previne que o polímero seja dissolvido em meio ácido e introduz grupos fosfatos, os quais possuem sítios básicos que poderão interagir com íons H_3O^+ e íons metálicos em solução aquosa. E o FTIR foi utilizado para verificar a presença das bandas do tripolifosfato no espectro das amostras reticuladas e identificaram uma banda de absorbância para o número de onda de 889 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do grupo P=O.

Nessa sequência de espectros (Figura 39) pode-se ainda perceber que devido ao fato do extrato alcoólico bruto de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants tripolifosfato (EAB) e a quitosana apresentarem muitos grupos funcionais coincidentes, os espectros apresentam as mesmas vibrações, como também pode ter ocorrido a sobreposição de bandas que elas vibrem na mesma intensidade.

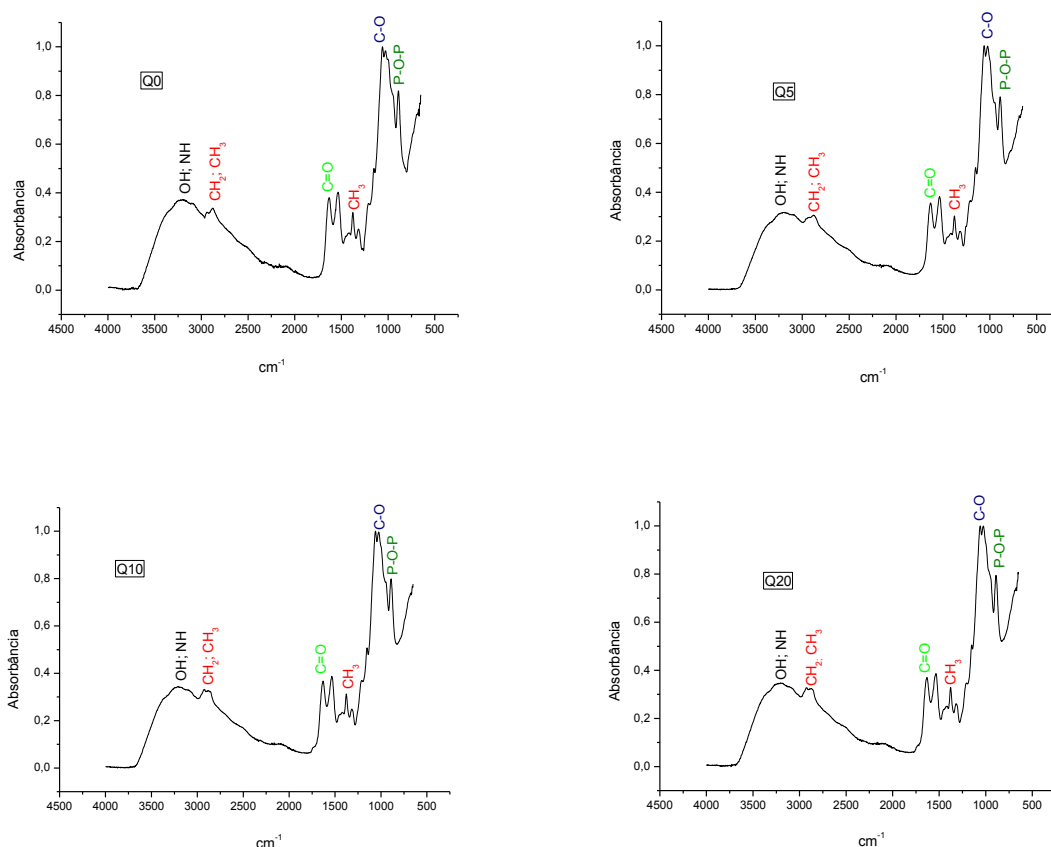


Figura 39 – Espectro na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier das esferas dos grupos Q0, Q5, Q10 e Q20 (Autor, 2016).

4.2.4 Medida do diâmetro das esferas

Foi feita uma média dos diâmetros de cinco esferas de cada um dos grupos (Q0, Q5, Q10 e Q20) para as esferas úmidas e após a secagem.

Quando da análise do diâmetro das esferas (em μm) com diferentes concentrações do extrato de mastruz, antes e após o processo de desidratação, observou-se efeito estatisticamente significativo da interação dos fatores “concentração” e “desidratação”. Nas condições do presente estudo, o poder estatístico obtido para essa análise foi considerado satisfatório ($>0,80$) (Apêndice B).

Conforme observado na Figura 40, as esferas de quitosana sem incorporação do extrato de mastruz (Q0) apresentaram diâmetro estatisticamente menor ($p<0,05$) em comparação aos demais grupos (Q5, Q10 e Q20) antes do processo de desidratação.

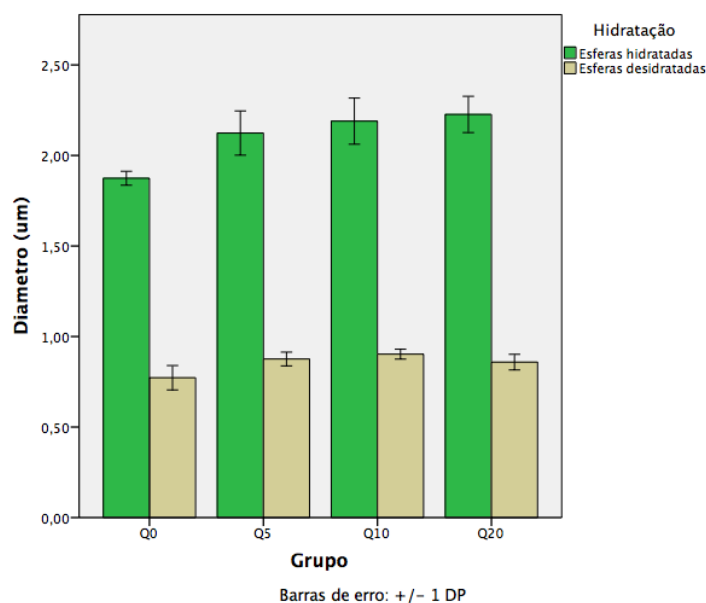


Figura 40 – Diâmetro das esferas de quitosana incorporadas com diferentes concentrações do extrato de *Dysphania ambrosioides* L. (mastruz), antes e após o processo de desidratação. Barras indicam média (µm) e \pm desvio-padrão (Autor, 2016).

Esse maior tamanho das esferas com EAB (Q5, Q10 e Q20) pode ter sido decorrente do fato de estarem mais reticuladas e absorveram mais umidade em relação às esferas de quitosana (Q0) e/ou consequência da presença de partículas do EAB; o que se pode dizer é que o EAB fez com que as esferas intumescessem mais.

Santos, Moura e Raffin (2003) incorporaram insulina em esferas de quitosana, e observaram um aumento no diâmetro das esferas, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho com a incorporação do extrato do matrutz.

Com relação ao tamanho das esferas após o processo de secagem na estufa, observou-se que aquelas pertencentes ao grupo Q0 também foram menores que as pertencentes aos demais grupos (Figura 40), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Também se observa a diferença de tamanho antes e após a secagem em cada grupo, o grupo Q20 teve uma maior redução que os demais, provavelmente devido à perda da umidade. A partir das médias dos diâmetros de cada grupo (Tabela 3) considerando os valores antes e após a secagem pode-se dizer que o grupo Q20 teve uma redução de 2,593 vezes, o Q10 de 2,425 vezes, o Q5 de 2,424 vezes e Q0 uma redução de 2,426 vezes.

Tabela 3 – Médias e desvio padrão das esferas úmidas e secas de cada grupo.

| Grupo | Hidratação | Médias (μm) | Desvio Padrão |
|-------|------------|--------------------------|---------------|
| Q0 | Úmidas | 1,8742 | 0,03841 |
| | Secas | 0,7724 | 0,06737 |
| Q5 | Úmidas | 2,1238 | 0,12206 |
| | Secas | 0,8758 | 0,03803 |
| Q10 | Úmidas | 2,1896 | 0,12747 |
| | Secas | 0,9026 | 0,02736 |
| Q20 | Úmidas | 2,2266 | 0,10021 |
| | Secas | 0,8586 | 0,04317 |

4.2.5 Ensaios de citotoxicidade *in vitro*

Os resultados apresentados na Tabela 4 demonstram que as amostras de todos os grupos apresentaram viabilidade celular, não sendo por tanto citotóxicas. Visto que de acordo com documento ISO 10993-5: 2009, a viabilidade celular (%) determina a citotoxicidade do material e se valores obtidos forem > 70 o material é considerado como não-citotóxico.

Tabela 4 – Percentual de viabilidade celular de cada grupo.

| Grupo | % de viabilidade | Desvio Padrão |
|------------|------------------|---------------|
| Q0 | 93 | ± 14 |
| Q5 | 93 | ± 14 |
| Q10 | 93 | ± 16 |
| Q20 | 96 | ± 13 |

Borges *et al.* (2012) compararam a toxicidade do óleo essencial de *C. ambrosioides* para células de mamíferos e concluíram que óleo não apresentou toxicidade contra as mesmas. Em outro teste, utilizando células renais de macaco, também não foi verificada toxicidade para o óleo essencial dessa espécie (Correa-Royero *et al.*, 2010).

Monzote *et al.* (2007) também avaliaram a toxicidade do óleo essencial de *C. ambrosioides*, para tanto, o mesmo foi administrado em camundongos infectados com *Leishmania amazonensis* pelas vias intraperitoneal, oral e intralesional. Foram examinados peritônio, baço, pâncreas, estômago, rim, fígado, as faces do diafragma, coração e pulmões. E observaram que a administração intraperitoneal

causou pequenos abscessos na cavidade peritoneal, enquanto que as administrações via oral e intralesional não mostraram sinais de toxicidade. Os autores afirmam que a não toxicidade do óleo essencial quando administrado por via oral facilita o tratamento em longo prazo.

Grassi (2011) realizou um teste *in vitro* de viabilidade celular, para tanto foi utilizado células não tumorais L929 frente a diferentes concentrações do extrato etanólico bruto (EEB) do mastruz, as mesmas células utilizadas no presente estudo. Com os resultados obtidos, ele concluiu que o EEB não reduziu a viabilidade celular em nenhuma das concentrações avaliadas (150, 300 e 500 mg/kg), quando comparadas ao controle negativo. O mesmo autor avaliou também os efeitos tóxicos do EEB de *C. ambrosioides* que pudessem inviabilizar o uso terapêutico da planta, e este não gerou hipotermia e alterações motoras nos camundongos e ratos testados quando se utilizou as mesmas concentrações do teste *in vitro* por via oral.

4.2.6 Ensaio de Biodegradação Enzimática *in vitro*

A capacidade de degradação de um biomaterial é um fator extremamente importante na performance do mesmo, pois isso pode afetar muitos processos celulares, incluindo o crescimento celular, regeneração tecidual e reposta do hospedeiro ao biomaterial (Fernandes, 2009b).

No trabalho de Fernandes (2009b) o ensaio de biodegradação das membranas de quitosana, puras e reticuladas, e de quitosana com sulfato de condroitina foi feito utilizando solução Phosphate Buffered saline (PBS). Os ensaios foram realizados à temperatura de 37°C, durante 1, 7 e 14 dias em triplicata. A degradação foi caracterizada como perda de massa. Cada uma das amostras foi pesada no início do experimento e depois de transcorridos 1, 7 e 14 dias. Procedimento semelhante foi realizado no trabalho atual, com a diferença que as amostras foram pesadas com 7, 14 e 21 dias, bem como uma solução de lisozima/PBS foi utilizada além da solução de PBS.

A análise de variância a três critérios demonstrou interação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os fatores estudados. Nas condições do presente estudo, o poder estatístico obtido foi considerado satisfatório ($> 0,80$) (Apêndice C).

Na presença de lisozima/PBS (Figura 41) foi possível observar que as esferas de todos os grupos apresentaram perda de massa estatisticamente significativa

($p < 0,05$), entre os momentos inicial e final em todos os tempos estudados, fato este mais evidente no grupo Q0, nos tempos de 14 e 21 dias quando se observou a degradação total das mesmas. O fato de ter havido perda de massa em todos os grupos demonstra a efetividade da lisozima.

A lisozima é a principal enzima responsável pela degradação *in vivo* da quitosana, pois ataca resíduos acetilados, encontrados em abundância nesse biomaterial (Hirano, Oeh e Ono, 1976). O fato do grupo no Q0 ter havido maior degradação comparado aos demais grupos, já que degradou totalmente no tempo final de 14 e 21 dias, corrobora com a hipótese de que o EAB agiu como agente reticulante e provocou a não degradação total nos grupos Q5, Q10 e Q20. Essa diferença que ocorreu entre os variados grupos e variados tempos, pode ter ocorrido devido à não uniformidade de distribuição do EAB em todas as esferas de um mesmo grupo. Isso pode explicar porque Q5 degradou mais em menos tempo, isto é, 7 dias e /ou porque Q5 degradou menos em todos os intervalos de tempo.

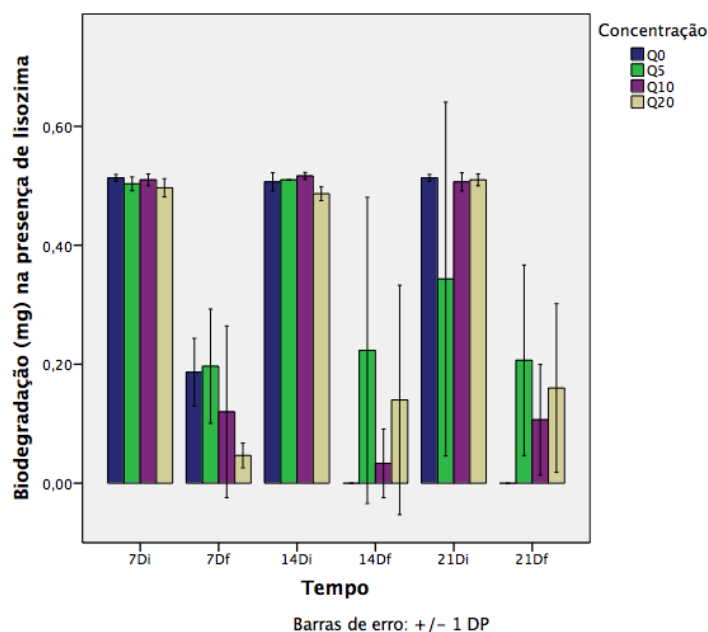


Figura 41 – Biodegradação das esferas de quitosana incorporadas com diferentes concentrações do extrato de *Dysphania ambrosioides* L. (mastruz), em diferentes tempos de análise (7Di- inicial de 7 dias; 7Df- final de 7 dias; 14Di- inicial de 14 dias; 14Df- final de 14 dias; 21Di- inicial de 21 dias e 21Df- final de 21 dias) na presença de lisozima. Barras indicam média (mg) e \pm desvio-padrão (Autor, 2016).

Cruz (2015) avaliou a biodegradação de arcabouços de quitosana, com 7, 14 e 21 dias, e obteve um resultado divergente desse estudo, pois observou que os arcabouços reticulados apresentaram maior perda de massa quando comparados

aos não reticulados. Destacando que é possível controlar a taxa de degradação, por meio da variação da concentração do reticulador e consequentemente controlar a liberação do próprio fármaco. Porém cabe salientar que na atual pesquisa todas as esferas estavam reticuladas pela ação do TPP, apenas a incorporação do EAB tornou as esferas ainda mais reticuladas

A taxa de degradação também pode ser controlada pelo grau de desacetilação da quitosana. Formas muito desacetiladas (DA > 85%) exibem taxas de degradação relativamente baixas e podem durar meses antes de serem reabsorvidas *in vivo*, enquanto formas com graus de desacetilação menores sofrem degradação mais rapidamente. A taxa de degradação também afeta as propriedades mecânicas e a solubilidade da quitosana (Kamiyama, Onishi e Machida, 1999). A quitosana utilizada no presente estudo possuía um grau de desacetilação entre 75 e 85%, dessa forma se justifica a degradação da mesma em períodos de tempo relativamente curtos como os avaliados.

Em outro estudo, membranas de quitosana com sulfato de condroitina degradaram mais rápido do que aquelas de quitosana pura. Uma possível explicação para esse fenômeno foi a alta solubilidade do sulfato de condroitina em água, e por isso, o mesmo foi liberado, ampliando a degradação da quitosana (Fernandes, 2009b). No presente estudo o extrato alcoólico bruto (EAB) de *Dysphania ambrosioides* apresentou dificuldade de solubilização, o que pôde ser observado no momento das diluições do mesmo na quitosana, antes da confecção das esferas; como também nas imagens obtidas com a microscopia ótica. Esse fato pode ter influenciado na degradação maior do grupo Q0.

Os produtos da degradação enzimática da quitosana são alguns oligossacarídeos de tamanhos diversos, dentre eles os oligômeros de N-acetil-D-glicosamina, os quais, além de apresentarem propriedades cicatrizantes e antimicrobianas, são totalmente absorvíveis pelo organismo (Lia *et al*, 2005).

No trabalho de Spin Neto (2008) sobre regeneração óssea, foi observado uma importante característica da quitosana, que foi a biodegradabilidade, pois nos dois períodos observados, 15 e 60 dias, não foi observado resquícios da mesma. A biodegradação de muitos polímeros tem sido estudada, especialmente da quitosana, por ser de fácil manipulação, favorecendo esse tipo de estudo. No presente trabalho se observou em todos os grupos e tempos avaliados que na presença da lisozima houve uma diminuição da massa das esferas, o que significa degradação das

mesmas, provavelmente se fossem analisadas por períodos maiores de tempo poderia ser observada a degradação total destas.

Na solução de PBS sem lisozima (Figura 42) pôde-se observar um ganho de massa, entre os momentos inicial e final, estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em quase todos os grupos e todos os tempos observados, exceção foi observada para as amostras com 5% do extrato de mastruz (Q5), entre os tempos de 14 dias inicial e final, as quais não diferiram entre si ($p > 0,05$), embora se observe também esse ganho.

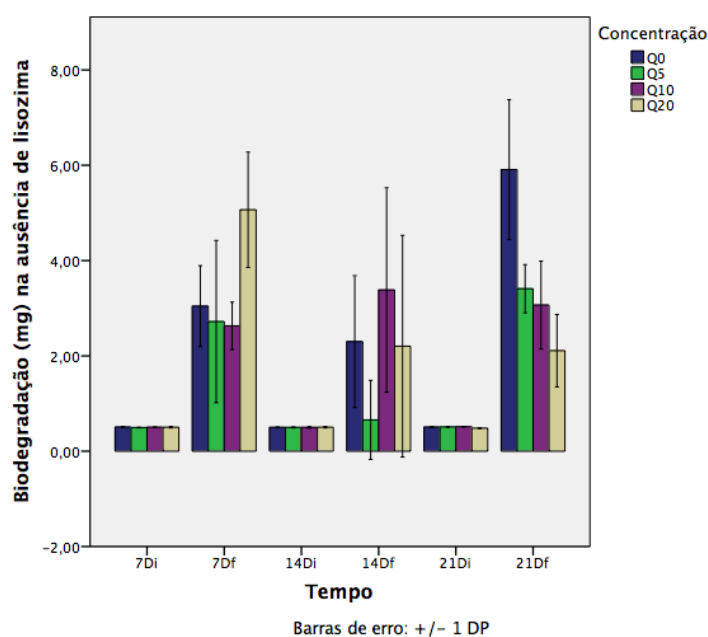


Figura 42 – Biodegradação das esferas de quitosana incorporadas com diferentes concentrações do extrato de *Dysphania ambrosioides* L. (mastruz), em diferentes tempos de análise (7Di- inicial de 7 dias; 7Df- final de 7 dias; 14Di- inicial de 14 dias; 14Df- final de 14 dias; 21Di- inicial de 21 dias e 21Df- final de 21 dias), na ausência de lisozima. Barras indicam média (mg) e \pm desvio-padrão (Autor, 2016).

O ganho de massa pode ser explicado pelo fato da quitosana, em soluções aquosas de ácidos diluídos, como a que foi utilizada para a fabricação das esferas, adquirir maior número de cargas positivas devido à protonação dos grupos amino de suas cadeias e passar a exibir o comportamento de um polieletrólito catiônico (Santos *et al*, 2003), apresentando caráter higroscópico, sendo capaz de absorver até 400% da sua massa inicial em meio aquoso (Campos, 2007).

4.2.7 Ensaio de compressão

Em relação à análise de forças compressivas, utilizando-se as médias obtidas, foi observado que as esferas de quitosana sem incorporação do extrato de mastruz (Q0) apresentaram máxima carga compressiva estatisticamente maior ($p < 0,05$) que às demonstradas pelos demais grupos nos quais houve a incorporação do extrato de mastruz (Q5, Q10, Q20) (Figura 43), ou seja, o grupo Q0 suportou maior carga compressiva antes de fraturar que os outros grupos.

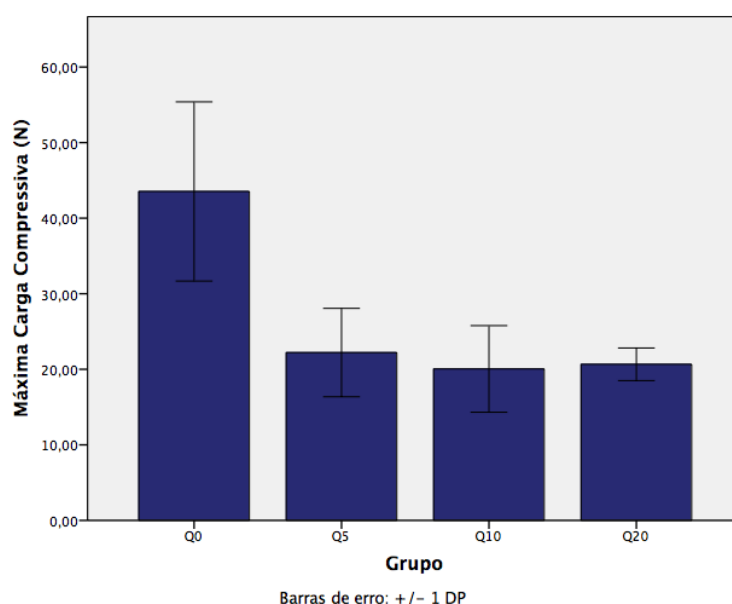


Figura 43 – Máxima carga compressiva (em N) das esferas de quitosana incorporadas com diferentes concentrações do extrato de *Dysphania ambrosioides* L. (mastruz). Barras indicam média (N) e \pm desvio-padrão (Autor, 2016).

Segundo a análise de variância a um critério (Apêndice D), a deformação compressiva em máxima carga compressiva não sofreu influência estatisticamente significativa da concentração do extrato de mastruz ($p > 0,05$). Porém como pode ser visualizado (Figura 44) o grupo Q0 deformou mais antes de fraturar, o que significa que possui uma maior deformação elástica, isto é, quando as esferas fraturavam já tinham se deformado bastante. Já as esferas dos grupos Q5, Q10 e Q20 deformaram menos, pois fraturaram mais rápido; essa maior fragilidade pode ser consequência de uma maior reticulação das esferas proveniente do extrato, como pode ser decorrente do fato de que as partículas do extrato podem determinar pontos de tensão na amostra.

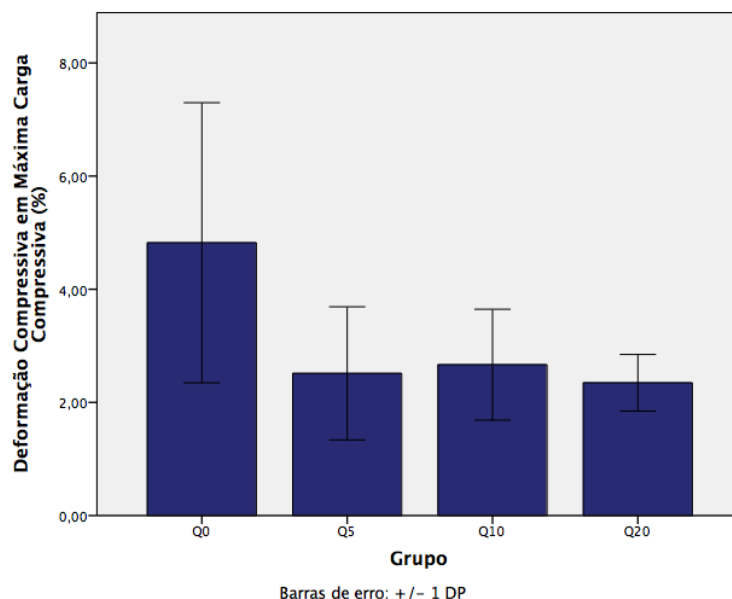


Figura 44 – Deformação compressiva em máxima carga compressiva (%) das esferas de quitosana incorporadas com diferentes concentrações do extrato de *Dysphania ambrosioides* L. (mastruz). Barras indicam média (%) e \pm desvio-padrão (Autor, 2016).

Silva (2015) desenvolveu arcabouços de quitosana/curcumina, pelo método de agregação de esferas, através da solução de gelatina (5%) com e sem reticulação e avaliou a propriedade mecânica de resistência a compressão. Foi observado que nos sistemas de quitosana/curcumina e de quitosana/curcumina (adsorção), a reticulação da gelatina não influenciou de forma significativa a tensão máxima do sistema, porém esta reticulação ocasionou o aumento da tensão máxima para o arcabouço de quitosana; proporcionando um aumento de quase três vezes quando comparado com os arcabouços de quitosana com gelatina não reticulada. Sendo assim, pode-se afirmar que a reticulação proporciona comportamentos mecânicos diferentes dependendo do material. Na atual pesquisa, se for o EAB contribuiu para a diminuiu a resistência mecânica a compressão das esferas. Cabe salientar que o sistema avaliado por Silva (2015) foram arcabouços e não esferas isoladas como na presente pesquisa.

4.3 Aplicações do mastruz baseadas em evidências

Estudos que abordam a espécie *Chenopodium ambrosioides*, atualmente chamada de *Dysphania ambrosioides* L. Mosyakin & Clemants, são escassos na literatura, o que restringe a quantidade de dados referenciais para comparação. A maior parte dos trabalhos se refere a estudos químicos e está relacionada em

grande parte à composição de seus óleos voláteis (Fecka, Kowalczyk e Cisowski, 2004; Farmacopéia Brasileira, 2010b).

Os achados da literatura revelam que o óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* é bastante promissor, apresentando diversas atividades biológicas. Porém, muito ainda precisa ser feito para identificar os compostos responsáveis pelas atividades e seus mecanismos de ação. Também são necessários mais estudos sobre os fatores que influenciam a composição do óleo e extratos, como sazonalidade, temperatura, região geográfica de cultivo; dentre outros, pois a variabilidade no teor dos constituintes majoritários e/ou ativos é uma das principais dificuldades de desenvolver fitoterápicos com reprodutibilidade de ação (Sá, 2013).

Oliveira *et al.* (2015) realizou um estudo de prospecção científica e tecnológica com ênfase na atividades farmacológicas, tomando por base as informações obtidas em artigos científicos disponíveis nas bases Web of ScienceTM, ScienceDirect, PubMed e Scielo, bem como em documentos de patentes nas bases USPTO (United States Patent and Trademark Office), EPO (European Patent Office), WIPO (World Intellectual Property Organization) e INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial- Brasil); utilizando a palavra “*Chenopodium ambrosioides*” nos campos título e resumo, respectivamente. Os mesmos concluíram que houve um aumento na quantidade de publicações e depósitos ao longo dos anos, porém de modo geral, a produção tecnológica envolvendo a espécie é relativamente baixa, sendo mais intensa apenas na China. Tais autores concluíram ainda que, de acordo com o Classificação Internacional de Patentes (CIP), as áreas de depósitos mais frequentes foram A01 e A61, que correspondem a aplicações nas áreas de Agricultura e Ciências Médicas e Veterinárias, respectivamente. A Tabela 5 apresenta de forma resumida os resultados encontrados nesse trabalho no que se refere aos artigos científicos. E a Tabela 6 os resultados referentes aos documentos de patentes.

Tabela 5 – Quantidade de artigos aproveitados e atividades citadas nas bases de dados.

| Base de Dados | Quantidade aproveitada | Atividades |
|-----------------|------------------------|---|
| Web of Science™ | 104 | Atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptiva, hipotensora, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante. Estudos químicos e de toxicidade. Atividade contra insetos da agricultura ou parasitoses em animais. Ação antifúngica, bactericida contra <i>Helicobacter pylori</i> resistente a vários antibióticos, inibição da corrosão do aço em solução de ácido sulfúrico. |
| ScienceDirect | 5 | |
| PubMed | 9 | |
| Scielo | 4 | |

Tabela 6 – Quantidade de documentos e atividades citadas nas bases de dados.

| Base de Dados | Quantidade | Atividades |
|---------------|------------|--|
| USPTO | 10 | Atividade herbicida, prevenção de infecções bacterianas e úlcera péptica. |
| EPO | 51 | Atividade antihemorrágica, agente antiacne, antialérgico e para tratamento de afecções de pele (como vitiligo e urticária, por exemplo) e seu clareamento. |
| WIPO | 64 | Anti-inflamatório, antibacteriano, cicatrizante, aplicações contra escleroderma e urticária, na agricultura como fertilizante, fungicida e repelente. |
| INPI | 4 | Anti-inflamatória, cicatrizante, encontra-se descrito método para obtenção de composição farmacêutica com o uso desta planta para utilização como enxerto ósseo. Ação fitotóxica da planta (aplicável à área de Agricultura). |

Sendo assim, o campo de pesquisa com o a espécie *Dysphania ambrosioides* L. Mosyakin & Clemants, tanto na área científica, para novas descobertas de propriedades terapêuticas; quanto na área tecnológica, principalmente no que se refere a patentes com finalidades médicas, encontra-se aberto. Ressaltando assim, a necessidade de um maior incentivo às pesquisas que gerem propriedade intelectual, tendo em vista o grande potencial farmacológico desta planta, principalmente no Brasil, que possui poucos pedidos de depósitos sobre esta espécie comumente encontrada no país (Oliveira *et al.*, 2015).

Neste momento cabe salientar que o objetivo da pesquisa foi a produção de esferas de quitosana que pudessem atuar como agente carreador do extrato de *Dysphania ambrosioides* L. Mosyakin & Clemants e cujos produtos de degradação

não fossem tóxicos e ainda pudessem atuar como osteoindutor. Sendo assim, o fato de todas as esferas terem sofrido biodegradação na presença de lisozima e com o aumento da concentração de EAB terem se tornado mais frágeis justifica seu uso como agente osteoindutor, isto é um material que possa induzir células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, iniciando o processo de remodelação óssea (Dimitriou, Tsiridis e Giannoudis, 2005). E não como um material osteocondutor; que são àqueles que servem de arcabouço para neoformação óssea, permitindo a migração celular, para o interior do defeito, e a proliferação de vasos sanguíneos, formando uma nova matriz óssea e portanto devem permanecer no organismo um tempo maior antes de serem degradados e ainda apresentar propriedades mecânicas semelhante ao tecido ósseo, já que esse processo é otimizado quando o material apresenta estrutura física e química semelhante à do osso (Giannoudis, Dinopoulos e Tsiridis, 2005).

Considerando os resultados obtidos na presente pesquisa e nos estudos de Ge *et al.* (2004) e Azevedo *et al.* (2013) que concluíram que a quitosana acelerou e maximizou o reparo ósseo, atuando como um biomaterial osteoindutor, de Sousa (2010) que concluiu que o extrato do mastruz apresentou efeitos antiinflamatório e cicatrizante nos tecidos pulpar e periodontal, além de estimular o reparo do osso alveolar por meio da proliferação fibroblástica e induzir a osteogênese do osso alveolar e de Penha (2012) que observou regeneração óssea mais acelerada no grupo em que utilizou o extrato de mastruz, sugere-se a realização de mais estudos para comprovar se as esferas de quitosana/ *Dysphania ambrosioides* L. Mosyakin & Clemants podem ser usadas como biomaterial para regeneração óssea por osteoindução.

5 CONCLUSÃO

- A metodologia para produção de esferas foi de fácil execução, sendo por tanto reprodutível;
- A Caracterização fitoquímica, demonstrou a presença de esteróides, saponinas e principalmente flavonóides no extrato alcóolico bruto (EAB) de *Dysphania ambrosioides* L. Mosyakin & Clemants;
- O estudo morfológico realizado por MO evidenciou a formação de esferas bem delimitadas e que se tornaram mais escuras, à medida em que se aumentou o percentual do EAB, evidenciando a incorporação deste;
- O estudo morfológico realizado por MEV revelou a presença de uma superfície externa enrugada e uma superfície interna de aspecto denso devido ao processo de secagem na estufa;
- O estudo químico realizado por meio do FTIR identificou todas as bandas características da quitosana em pó, do EAB, do TPP e das esferas produzidas.
- A medida do diâmetro das esferas sem incorporação EAB (Q0) foi menor em comparação aos demais grupos (Q5, Q10 e Q20), sendo estatisticamente significativa para as esferas úmidas e não significativa para as esferas secas;
- Todas as amostras foram consideradas não citotóxicas;
- Na presença de lisozima, as esferas de todos os grupos apresentaram perda de massa em todos os tempos estudados, fato este mais evidente no grupo Q0, nos tempos de 14 e 21 dias. Na ausência de lisozima na solução de PBS pôde-se observar um ganho de massa em todos os grupos para todos os tempos observados;
- O grupo Q0 suportou maior carga compressiva e também deformou mais antes de fraturar quando comparado aos grupos Q5, Q10 e Q20;
- Conclui-se que todas as esferas apresentaram características que possivelmente possam ser utilizadas como biomaterial osteoindutor, visto que o produto da degradação pode atuar como tal. E que as pertencentes ao grupo Q20, por apresentarem uma maior concentração de EAB, podem ser usadas em uma menor quantidade, sem perda das propriedades terapêuticas do mesmo. Em se tratando de áreas com dimensões anatômicas reduzidas; como as regiões maxilo-faciais, esta seria uma vantagem.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar o processo de congelamento e liofilização em substituição à secagem na estufa e repetir as caracterizações e medir os poros obtidos;
- Avaliar a citotoxicidade frente a células ósseas;
- Avaliar *in vitro* a atividade osteoindutora, por meio da cultura de células;
- Estudar a liberação do EAB no meio biológico;
- Avaliar outras concentrações de EAB;
- Aumentar o tempo e/ou a concentração do TPP a fim de se aumentar o tempo de biodegradação;
- Verificar se é possível observar a presença de poros nas esferas após a reidratação das mesmas;
- Avaliar *in vivo*, com animais, o potencial osteoindutor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, U. P.; HAMAZAZI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.678-689, 2006.

ALMEIDA, M. A. O. DE; DOMINGUES, L. F.; ALMEIDA, G. N.; SIMAS, M. M. DOS S.; BOTURA, M. B.; CRUZ, A. C. F. G. DA; SILVA, A. V. A. F. DA; MENEZES, T. P.; BATATINHA, M. J. M. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Mentha piperita* L. e de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre cultivos de larvas infectantes de neumatóides gastrintestinais de caprinos. **Rev. Bras. Parasit. Vet.** v.16, n.1, p. 57-59, 2007.

ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais**. 2ª edição. Editora EDUFBA, p.31-39,147,181. 2003.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. v. 3, p.1-15, 2001.

APARECIDA A. H. Recobrimento de Apatitas Empregando-se o Método Biomimético: Estudo da Influência dos Íons K⁺, Mg²⁺, SO₄²⁻ e HCO₃⁻ na Formação de Hidroxiapatita. **Dissertação (Mestrado)**. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 115f, 2006.

APG III 2009: An up date of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Bot. J. Linn. Soc.**, v.161, n. 2, p.105-121, 2009.

ARISAWA, M.; MINABE, N.; SAEKI, R.; TAKAKUWA, T.; NAKAOKI, T. Studies on unutilized resources. V. Components of the flavonoids in *Chenopodium* genus plants. 1. Flavonoids of *Chenopodium ambrosioides*. **Yakugaku Zasshi**, v. 91, n. 5, p. 522-524, 1971.

ARTZI, Z.; KOZLOVSKY, A.; NEMCOVSKY, C.E.; WEINREB, M. The amount of newly formed bone in sinus grafting procedures depends on tissue depth as well as the type and residual amount of the grafted material. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 2, p. 193–199, 2005.

ASTM International: F1635-04 **Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants**, 2009.

ASTM International: F2103-01 **Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications**, 2007.

AUBIN, J. E.; LIU, F. The osteoblast lineage In: BILIZEKIAN, J., RAISZ, L., RODAN, G. Principles of bone biology. **Academic press**, p. 39-50, 1996.

AZEVEDO, A. S.; SÁ, M. J. C.; FOOK, M. V. L.; NÓBREGA NETO P. I.; SOUSA, O. B.; AZEVEDO, S. S. Hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos: Estudo histológico e morfométrico. **Ciência Rural**, v.43, n.7, p.1265-1270, 2013.

AZEVEDO, M. M. **Nanoesferas e a Liberação Controlada de Fármacos**. Monografia - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, 2002.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK M. V. L.; COSTA; A. C. F. M. Quitina e Quitosana: Aplicações como Biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BATYCKY, R. P.; HANES, J.; LANGER, R. E.; EDWARDS, D. A. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 86, n. 1, p. 464- 477, 1997.

BITENCOURT, C.M. **Desenvolvimento e aplicação de filmes á base de gelatina aditivados com extrato etanólico de cúrcuma (*Curcuma longa* L.)**. Dissertação (Mestrado em Ciência da Engenharia de Alimentos). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga – São Paulo, 107f, 2013.

BOËCK-NETO R. J; ARTESE L.; PETTRELLI A.; SHILBLI J.A.; PERROTTI V.; PICCIRILLI M. VEGF an MVD expression in sinus augmentation with autologous bone and several graft materials. **Oral Dias**, v.15, n. 2, p. 148-154, 2009.

BORAH, G.; SCOTT, B.; WORTHAM K. Bone induction by chitosan in endochondral bones of extremities In: BRINE, C. J., SANDFORD, P. A., ZIKAKIS, J.P. **Advances in chitin and chitosan**: Elsevier, p. 206-215,1992.

BORBA, A. M.; MACEDO, M.; WALTER, L. R. F. Odontologia alternativa com plantas medicinais na Chapada dos Guimarães - Mato Grosso - Brasil. **Rsbo**, v. 5, n. 1, p.43-49, 2008.

BORGES, A. R.; AIRES, J. R. A.; HIGINO, T. M. M.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Exp Parasitol**. v.132, n. 2, p.123-128, 2012.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Tropical Plant Pathology**. Brasília, v.36 n.1, 2011.

BOURGUIGNON FILHO, A. M. Fraturas orbitárias blowout: tratamento com telas de titânio. **Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac.**, v. 5, n. 3, p. 35 – 42, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **The Phytotherapy in SUS and the Medicinal Plants Research Program of the Central of Medicines**, Brasília, 149p., 2006.

BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLO, V. R.; RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screen in some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 195-202, 2006.

BRITO, M. V. H.; CARVALHO, D. S.; ALBUQUERQUE, A. M. M. Efeito do extrato de mastruz em culturas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Paraense De Medicina**, v. 21, n. 1, p.21-25, 2007.

CALASANS-MAIA, M. D.; FERNANDES, G. V. O.; GRANJEIRO, J. M. Preservação alveolar com enxertos após exodontias e previamente à instalação de implantes. **ImplantNews**, v. 5, n. 6, p. 583-590, 2008.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, C.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CAMPOS, M. G. N. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana para recobrimento de feridas e liberação controlada de fármacos**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 96f, 2007.

CARVALHO, P. S. P.; VASCONCELLOS, L. W.; PI, J. Influence of bed preparation on the incorporation of autogenous bone grafts: a study in dogs. **Int J Oral Maxillofac Impl.** v. 15, n. 4, p. 565-570, 2000.

CAVALLI, J. F.; TOMI, F.; BERNARDINI, A. F.; CASANOVA, J. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ^{13}C -NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochem Anal.**, v.15, n. 5, p.275-279, 2004.

CHEUNG, H. Y.; LAU, K. T.; LU, T. P.; HUI D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. **Composites Part B: Engineering**, v. 38, n. 3, p. 291–300, 2007.

CORDAS, C. M. Biomateriais: utilização e controle em meios fisiológicos. **Revista Proformar**, v. 13, p. 11, 2006.

CORREA-ROYERO, J.; TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; MESA-ARANGO, A. *In vitro* antifungal activity and citotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 20, n. 5, p.734-741, 2010.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. **Quitosana: a fibra do futuro**. Parque de Desenvolvimento Tecnológico – PADETEC, Fortaleza,1999.

CRUZ, J. B. **Arcabouços de quitosana/agente antineoplásico: síntese, caracterização e aplicação**. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Centro de Ciência e Tecnologia. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 118f, 2015.

CUNHA, V. P. P.; MARCHINI, L. **Prótese total implantossuportada: Passo a passo clínico e laboratorial**. Ed. Santos, 1ª edição, 2010.

DACULSI, G. **Micro macroporous calcium phosphate bioceramics**. Business Briefing: Global Surgery, 2004.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITEB, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical Applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 981–1014, 2011.

DAVIES, J. Understanding peri-implant endosseous healing. **J Dent Educ.**, v. 67, n. 8, p. 932-949, 2003.

DELESPAUL, Q.; BILLERBECK, V. G.; ROQUES, C. G.; MICHEL, G.; MARQUIER-VINUALES, C.; BESSSIÈRE, J. M. The antifungal activity of oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, v.12, n.2, p.256-266, 2000.

DEMBITSKY, V.; SHKROB, I.; HANUS, L. O. Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.**, V.152, n. 2, p. 209-215, 2008.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 703–714, 2004.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais da Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. Revista e ampliada. São Paulo: Editora UnESP, 2003.

DIETMAR, W. H.; GARCIA, A. J. Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells. **Gene**, v. 347, p. 1-10, 2005.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, v. 36, n. 12, p. 1392-1404, 2005.

EINHORN, T. A. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. **Clin. Orthop. Relat.**, v. 367, p. 559-567, 1999.

ELLIS E.; SINN, D. P. Use of homologous bone in maxillofacial surgery. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.51, n. 11, p. 1181-93,1993.

EVANS, E., KENT, S. P. The use of basic polysaccharides in histochemistry and cytochemistry: precipitation and agglutination of biological materials by *aspergillus* polysaccharide and deacetylated chitin. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 10, p.24-28, 1962.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5.ed. Volume 2. Brasília, Brasil: Anvisa, 2010b. 546p.

FÁVERE, V. T.; LARANJEIRA, M. C. M. Quitosana: Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p.672-678, 2009.

FECKA, I.; KOWALCZYK, A.; CISOWSKI, W. Optimization of the separation of flavonoid glycosides and rosmarinic acid from Menha piperitaon HPTLC plates. **Journal of Planar Chromatography**, v.17, n.1, p.22-25, 2004.

FERNANDES, B. M. P. **Influência do Processo de Reticulação no Comportamento de um Compósito de Poli (Dimetilsiloxano)**. 2009. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências de Materiais). Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, 133f, 2009a.

FERNANDES, L. L. **Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas**. Monografia (Graduação em Engenharia de Materiais) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 63f, 2009b.

FIDÉLES, T. B. **Filmes Reticulados de Quitosana para Aplicação como Biomaterial**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, 72f, 2010.

FISHER, E. **Pyrilinks-D immulite: Testando a reabsorção óssea de maneira simples**. Disponível em: <http://www.dpcmedlab.com.br/areacientifica/artigo_116.pdf>. Acesso em: 25 Jun. 2015.

FONTES, R. A. M. **Desenvolvimento e Caracterização de Arcabouços à Base de Fosfatos de Cálcio**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa – Portugal, 126f, 2010.

FOOK, A. C. B. M. **Produção e caracterização de arcabouços compósitos HA/Biopolímero para engenharia de tecidos**. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Centro de Ciência e Tecnologia. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2012.

FOOK, M. V. L. **Desenvolvimento da técnica de deposição de hidroxiapatita na superfície de polietileno de ultra-peso molecular para aplicação como biomaterial**. Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 127 f, 2005.

FRAGA A. F.; ALMEIDA FILHO E.; RIGO E. C. D.; BOSCHI A. O. Synthesis of chitosan/hydroxyapatite membranes coated with hydroxycarbonate apatite for guided tissue regeneration purposes. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 9, p.3888-3892, 2011.

GADANO, A. B, GURNI, A. A., CARBALLO, M.A. Argentine folk medicine: Genotoxic effects of Chenopodiaceae family. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p. 246-251, 2006.

GBOLADE, A. A.; TIRA-PICOS, V.; NOGUERIA, J. M. F. Chemical constituents of *Chenopodium ambrosioides* var. anthelminticum herb essential oil from nigeria. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 46, n. 4, 2010.

GE, Z.; BAQUENARDS, S.; LIM, L. Y.; WEE, A.; KHOR, E. Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. **Biomaterials**, v. 25, n. 6, p.1049-1058, 2004. Disponível em: <<http://link.periodicos.capes.gov.br.ez15.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl3>>. Acesso em: 12 jul. 2015.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury**, v. 36, n. 3, p. 20-27, 2005.

GORDH, M.; ALBERIUS, P. Some basic factors essential to autogeneic nonvascularized onlay bone grafting to the craniofacial skeleton. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.**, v. 33, n. 2, p.129-46, 1999.

GORZELANNY, C.; POPPLELMANN, B.; PAPPLELBAUM, K.; MOERSCHBACHE, B. M.; SCHNEIDER, S. N. Human macrophage activation triggered by chitotriosidase-mediated chitin and chitosan degradation. **Biomaterials**, v.31, p.8556-8563, 2010. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br.ez15.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004>. Acesso em: 12 jul. 2015.

GRASSI, L. T. ***Chenopodium ambrosioides* L. Erva de Santa Maria (amaranthaceae): estudo do potencial anti-inflamatório, antinociceptivo e cicatrizante**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, p.147, 2011.

GUINESI, L. S.; ESTEVES, A. A., CAVALHEIRO, E. T. G. Adsorção de íons cobre (II) pela quitosana usando coluna em sistema sob fluxo hidrodinâmico. **Quim. Nova**, v. 30, n. 4, p.809-814, 2007.

HELMUS, M. N.; TWEDEN K. "Materials Selection", In: **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering**, Part A, v.1, p.27-59, 1995.

HENCH, L. L. e WILSON, J. **Bioactive Glasses. An Introduction to Bioceramics**, World Scientific, Singapore, Cap.3, p.41-62, 1993.

HIRANO, S. **Biotechnology**. Annual Research, v. 2, 237-258, 1996.

HIRANO, S.; OEH, Y.; ONO, H. Selective N-acylation of chitosan. **Carbohydr. Res**, v. 47, n. 2, p. 315-320, 1976.

HISLOP, W. S.; FINLAY, P. M., MOOS, K. F. A preliminar study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. **Br J Oral Maxillofac Surg.**, v. 31, p.149-53, 1993.

HMAMOUCHI, M.; LAHLOU, M.; AGOUMI. A. Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants. **Fitoterapia**, v.71, p.308-14, 2000.

HOLANDA, A. L. **Membranas de quitosana para uso em sistema de liberação controlada de insulina: síntese e caracterização**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 113f, 2011.

ISO 10993-5:2009: **Biological evaluation of medical devices** - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.

JARAMILLO, B. E.; DUARTE, E.; DELGADO, W. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. **Rev Cubana Plant Med.** v.17, n. 1, p. 54-64, 2012.

JARDIM, C. M. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 1213-1218, 2008.

JAVED, F.; ROMANOS G. E. The role of primary stability for success ful immediate loading of dental implants. A literature review. **Journal of dentistry**, v.38, n. 8, p. 612-620, 2010.

JAYAKUMAR, R.; RAMACHANDRAN, R.; P.T. KUMAR, S.; DIVYARANI, V. V.; SRINIVASAN, S.; CHENNAZHI, K. P.; TAMURA, H.; NAIR, S. V. Fabrication of chitin-chitosan/nano ZrO₂ composite scaffolds for tissue engineering applications. **Int J Biol Macromol**, v. 49, n.3, p. 274-280, 2011.

JUNG, U. W.; SONG, K. Y.; KIM, C. S.; LEE, Y. K.; CHO, K. S.; KIM, C. K.; CHOI, S. H. Effects of chitosan membrane coated with polylactic and polyglycolic acid on bone regeneration in rat calvarial defect. *Biomed. Mater.* v.2. p. S101-S105, 2007.

JUNG, Y. S.; KIM, H. J.; CHOI, S. W.; KANG, J. W.; CHA, I. H. Regional thickness of parietal bone in Korean adults. *Int J Oral Maxillofac Surg.*; v. 32; n. 6, p. 638-641, 2003.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 556p.

KAHN, A.; SHLOMI, B.; LEVY, Y.; BETTER, H.; CHAUSHU, G. The use of autogenous block graft for augmentation of the atrophic alveolar ridge. **Refuat Hapeh Vehashinayim**, v. 20, n. 3, p. 54-64, 2003.

KAMIYAMA, K.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Biodisposition characteristics of N-succinyl-chitosan in normal and tumor-bearing mice. **Biol Pharm Bull**, v. 22, n. 2, p. 179-186, 1999.

KAŠPAR, ONDŘEJ; JAKUBEC, MARTIN; ŠTĚPÁNEK, FRANTIŠEK. Characterization of spray dried chitosan–TPP microparticles formed by two- and three-fluid nozzles. **Powder Technology**, v. 240, p. 31-40, 2013.

KATCHBURIAN, E., ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3ª edição, 2014.

KATTI, K. S.: Biomaterials in total joint replacement: colloids and surfaces B. **Biointerfaces**, v. 39, p. 133 -142, 2004.

KHAN, S. N.; CAMMISA-Jr., F. P.; SANDHU, H. S.; DIWAN, A. D.; GIRARDI, F. P.; LANE, J. M. The biology of bone grafting. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v.13, n.1, p. 77-86, 2005.

KHAN, S. N.; TOMIN, E.; LANE, J. Clinical applications of bone graft substitutes. **Orthop. Clin.**, v. 31, p. 389-398, 2000.

KHOR, E.; LIM, L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v.24, p.2339-2349, 2003. Disponível em: <<http://link.periodicos.capes.gov.br/ez15.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl3?urlver=Z39.88-2004>>. Acesso em: 14 ago. 2011. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00026-7.

KO, J. A.; PARK, H. J.; HWANG, S. J.; PARK, J. B.; LEE, J. S. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1-2, p. 165-174, 2002.

KOBA, K.; CATHERINEB, G.; RAYNAUDC, C.; CHAUMONTB, J. P.; SANDAA, K.; LAURENCE, N. Chemical composition and cytotoxic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. essential oil from togo. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 44, n. 4, p. 435-440, 2009.

KONTIO, R. Treatment of orbital fractures: the case for reconstruction with autogenous bone. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 2, n. 7, n. 863-868, 2004.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.126-139, 2004.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. 2003. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**.5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da FSC, p.247-262, 2007.

LAUS, R., LARANJEIRA, M. C. M., MARTINS, A. O. Esferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro(iii) e manganês(ii) de águas contaminadas pela mineração de carvão, **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 34-39, 2006.

LE DUNG, P.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; DESBRIÈRES, J.; **Carbohydr. Polym.**, v. 24, 1994.

LEAL, J. S. **Estudo etnofarmacológico das espécies medicinais *Cleome spinosa*, *Pavonia varians* e *Croton cajucara***. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 130p 2008.

LIA, J.; DUA, Y.; YANGA, J.; FENGA, T.; LIA, A.; CHEN, P. Preparation and Characterization of low molecular weight chitosan and chito-oligomers by a commercial enzyme. **Polymer Degradation and Stability**, v. 87, n. 3, p. 441-448, 2005.

LIM, S. C.; LEE, M. J.; YEO, H. H. Effect of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. **Pathol. Int.**, v. 50, p. 594-602, 2000.

LIMA, A. L.; MAGALHÃES, S.A.; SANTOS, M.R.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas na cidade de Vilhena, Rondônia. **Revista Pesquisa & Criação**, v.10, p.165-179, 2011.

LIMA, M. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SANTANA, W. A.; KANETO, C. M.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, p. 112-117, 2013.

LIMA, R. S. C. **Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana/Insulina**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande, 112f, 2010.

LIN, H. R., CHEN, K. S., CHEN, S. C. Attachment of stem cells on porous chitosan scaffold crosslinked by $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, **Materials Science and Engineering**, v. 27, n.2, p. 280–284, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

LUDWIG, S. C., KOWALSKI, J. M.; BODEN, S. D. Osteoinductive bone graft substitutes. **Eur Spine J.**, v. 9; n. 1, p.119-25, 2000.

MA. L.; LIU, C. Colloids and Surfaces: **Biointerfaces**, v.75, n.448, 2010.

MACIEL, M. A. M.; MARTINS, J. R.; PINTO, A. C.; KAISER, C. R.; ESTEVES-SOUZA, A.; ECHEVARRIA, A. Natural and semi-synthetic clerodanes of *Croton cajucara* and their cytotoxic effects against Ehrlich carcinoma and human k562 leukemia cells. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.18, n.2, p.391-396. 2007a.

MARINS, A. K.; VIEIRA, D. F.; QUADROS, I. P. S.; PINHEIRO, P. F.; QUEIROZ, V. T.; COSTA, A. V. Prospecção fitoquímica das partes aéreas da Erva-de-Santa-Maria (*Chenopodium ambrosioides* L.). In: **Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e Encontro Latino Americano de Pós Graduação**, Alegre, Espírito Santo, v. 15, p.1-5, 2011.

MATOS, J. A. L. **Potencial biológico de *Chenopodium ambrosioides* L. (Erva - de - Santa - Maria)**. Dissertação (mestrado) - Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2011.

MENDES, V. C. **Influência da matriz de esmalte dentário (Emdogain®) sobre o processo de reparo alveolar: análise histológica e histométrica em ratos**. Araçatuba, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista, 167f, 2000.

MINCHEVA, R.; MANOLOVA, N.; SABOV, R.; KIVRKCHIEV, G.; RASHKOV, I. Hydrogels from chitosan crosslinked with poly(ethyleneglycol) diacid as bone regeneration materials. **E-Polymers**, v. 4, n. 1, p. 643-653, 2013.

MISCH, C. E. et al. Rationale for the application of immediate load in implant dentistry: Part I. **Implant Dentistry**, Baltimore, Maryland, v.13, n.3, p.207-217, Sep. 2004.

MONTANARI JR., I. **Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas**. 2002. Disponível no site: <<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/index.html>> Acesso em 28 de Fevereiro de 2015.

MONZOTE L, MONTALVO AM, SCULL R, MIRANDA M, ABREU J. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: A preliminary study. **Biomed Pharmacother.**, v. 61, n. 2, p. 148-53, 2007.

MORAES JÚNIOR, E. F. **Enxerto autógeno para aumento em espessura e ou altura do processo ósseo alveolar, transtornos de técnica cirúrgica, complicações e sobrevivência dos implantes.** Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de Aracatuba, 136f, 2002.

MORAIS, S. M.; DANTAS, J. D. P.; SILVA, A. R. A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** v.15, n.2, p.169-177, 2005.

MUÑOZ-ACEVEDO, A.; KOUZNETSOV, V. V.; STASHENKO, E. E. Composición y capacidad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, trans-Anetol o Estragol. **Revista de la Universidad Industrial de Santander: Salud**, v. 41, n. 3, p. 287-294, 2009.

MUZZARELI, R. A. A.; MATTIOLI-BELMONTE, M.; TIETZ, C.; BIAGINI, R.; FERIOLI, G.; BRUNELI, M. A.; FINI, M.; GIARDINO, R.; ILARI, P.; BIAGINI, G. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. **Biomaterials**, v.15. p.1075-1081, 1994. Disponível em: <<http://link.periodicos.capes.gov.br/ez15>>.

NASCIMENTO, F. R.; CRUZ, G. V.; PEREIRA, P. V.; MACIEL, M. C.; SILVA, L. A.; AZEVEDO, A. P.; BARROQUEIRO, E. S.; GUERRA R. N. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v.78, n. 22, p.2650-2653, 2006.

NÓIA, C. F.; CHAVES NETTO, H. D. M.; LOPES, R. O.; RODRÍGUEZ-CHESSA, J.; MAZZONETTO, R. Uso de Enxerto Ósseo Autógeno nas Reconstruções da Cavidade Bucal. Análise Retrospectiva de 07 Anos. Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial, v.50, n.4, p. 221-225, 2009.

NORTON, M. R. A short-term clinical evaluation of immediately restored maxillary TiOblast single -tooth implants. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.19, n.2, p.274-281, 2004.

NORTON, M. R.; WILSON, J. Dental implants placed in extraction sites implanted with bioactive glass: human histology and clinical outcome. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.17, n. 2, p.249-57, 2002.

OLIVEIRA, A. P.; ARAÚJO, S.; LIMA, E. B. S.; SOUZA, L. K. M.; ALVARENGA, E. M.; MEDEIROS, J. V. R. Prospecção científica e tecnológica de *chenopodium ambrosioides*, com ênfase nas atividades farmacológicas. **Cad. Prospec.**, Salvador, v. 8, n. 4, p. 804-814, 166f, 2015.

OLIVEIRA, S. S. L. **Desenvolvimento de arcabouços de quitosana/hidroxiapatita para liberação controlada de fármacos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Centro de Ciência e Tecnologia. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2015.

OLSZTA, M. J.; CHENG, X.; JEE, S.S.; KUMAR, R.; KIM, Y.; KAUFMAN, M. J.; DOUGLAS, E. P.; GOWER, L. B. Bone structure and formation: A new perspective. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v.58, n. 35, p. 77-116, 2007.

Organização Mundial de Saúde (OMS). **Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales**, Ginebra, 2003.

PANG, J. L.; RICUPERO, D. A.; HUANG, S.; DHIRENDRA, N. F.; SINGH P.; ROMERO, J. R.; CHATTOPADHYAY, N. Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumor necrosis factor receptor family signaling in bone cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, 2006.

PAOLANTONIO, M.; DOLCI, M.; SCARANO, A.; D'ARCHIVIO, D.; DI PLACIDO, G.; TUMINI, V.; PIATTELLI, A. Immediate Implantation in fresh extraction sockets. A controlled clinical and histological study in man. **Journal of Periodontology**, v.72, n.11, p.1560-1571, 2001.

PARK, S. H., LLINÁS, A., GOEL, V.K. **Hard Tissue Replacements**. The Biomedical Engineering Handbook: 2. ed., Boca Raton: CRC Press LLC. v. 45, n. 1, 2006.

PARRA, A. V. et al. Evaluación mutagénica de un extracto fluido con un menstruo etanólico al 70% de *teloxys ambrosioides*. weber (apasote); **Revista Cubana de Plantas Medicinales**; v.5, n. 3, p.102- 105, 2000.

PENHA, E. S. **Efeito do mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L) no processo de reparo ósseo de ratos**. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Potiguar. Natal, 59f., 2012.

PEREIRA, N.; AQUINO, P.; SILVA, M.; NASCIMENTO, E.; GRANGEIRO, A.; OLIVEIRA, C.; TINTINO, S.; FIGUEIREDO, F.; VERAS, H.; MENEZES, I. Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tópico de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 2, p. 73-159, 2015.

PEREIRA, W. S. ***Chenopodium ambrosioides* L. Avaliação toxicológica e ação na resposta inflamatória**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 93f, 2009.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery, **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 447-451, 2001.

PINHEIRO NETO, V. F.; RIBEIRO, R. M.; MORAIS, C. S.; VIEIRA, D. A.; GUERRA, P. C.; ABREU-SILVA, A. L.; SILVA-JÚNIOR, J. R.; BORGES, M. O. R.; BORGES, A. C. R. *Chenopodium ambrosioides* in the repair of fractures in rabbits. *International Journal of Pharmacology*, v. 11, n. 7, p. 732-737, 2015.

POGORELOV M. V.; SIKORA V.Z.; BUMEYSTER V.I. In-vivo tests of new chitosan–hydroxyapatite composite biomaterials. **Bone**, v. 48, n.2, p.167, 2011.

PRASAD, C. S.; SHUKLA, R.; KUMAR, A.; DUBEY, N. K. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martini* and *Chenopodium ambrosioides* and their synergism against dermatophytes. **Mycoses**. v.53, p.123-129, 2010.

PURICELLI, E. A Multidisciplinaridade da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais na Odontologia. In: Vanzillotta, P. S.; Gonçalves, A. R. **Odontologia Integrada. Atualização Multidisciplinar para o Clínico e o Especialista**. Rio de Janeiro: Pedro Primeiro. Cap. 2, p. 59-94, 2000.

RATNER, B. D. A history of Biomaterials. In: Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemos J. E. (Eds), **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**, 2 ed., 2004.

RAUH, L. K. **Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica da Vernonia scorpioides (Lam) Persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná, 135p, 2008.

RIBEIRO, L. L. G. **Avaliação histológica do comportamento da matriz dérmica acelular e do vidro bioativo no processo de reparo de cavidade cirúrgica em tíbia de rato**. Dissertação– Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 137f 2003.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v.6, n.3, p.317-320, 2003.

RUBIN, P. J.; YAREMCHUCK, M. J. Complications and toxicities of implantable biomaterials used in facial reconstructive and aesthetic surgery: a comprehensive review of the literature. **Plast Reconstr Surg.**, v. 100, n. 5, p.1336-1353, 1997.

SÁ, R. D. **Estudo farmacognóstico de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SÁ, R. D.; FERREIRA, M. R. A.; SANTANA, A. S. C. O.; SOARES, L. A. L.; RANDAU, K. P. Histoquímica e quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. In: **22º Simpósio de Plantas Medicinais no Brasil**, Bento Gonçalves, 2012.

SAKATA, M. M.; ALBERTO RINCON, M. C.; DUEK, E. A. R. Estudo da Interação polímero/cartilagem/osso utilizando poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) e poli (p-dionaxona) em cômulo femoral de coelhos. **Polímeros**, v.14, n. 3, p.176-180, 2004.

SANTOS, C. A. N. S. **Propriedades de filmes de quitosano – influência do grau de acetilação e da massa molecular do biopolímero**. Dissertação (Mestrado em Química e Qualidade dos Alimentos) – Universidade de Aveiro, Aveiro – Pt, 2006.

SANTOS, C.; SEABRA, P.; VELEIRINHO, B.; DELGADILLO, I.; SILVA, J. A. L. Acetylation and molecular mass effect on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. **European Polymer Journal**, v. 42, n. 12, p. 3277-3285, 2006.

SANTOS, E. B; DANTAS, G. S.; SANTOS, H. B.; DINIZ, M. F. F.; SAMPAIO, F. C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 1b, p. 321-324, 2009.

SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA, S. P.; CAVALHEIRO, E. T. **Caracterização de Quitosanas Comerciais**. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SANTOS, J. V.; MOURA, T. F. A.; RAFFIN, F. N. Otimização dos Parâmetros de Secagem por Aspersão de Micropartículas de Quitosana como Carreadores de Insulina. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 22, n.4, p. 327-333, 2003.

SCHWARTZ-ARAD, D.; LEVIN, L. Intraoral autogenous block onlay bone grafting for extensive reconstruction of atrophic maxillary alveolar ridges. **J Periodontol.**, v. 76, n. 4, p. 636- 641, 2005.

SENNA, L. *Chenopodium* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4313>>. Acesso em: 31 Ago 2015

SHU, X. Z.; ZHU, K. J. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 201, p. 51-58, 2000.

SICCA, C. M.; OLIVEIRA, R. C.; SILVA, T. L.; CESTARI, T. M.; OLIVEIRA, D. T.; BUZALAF, M. A. R.; TAGA, R.; TAKA, E. M.; GRANGEIRO, J. M.; KINA, J. R. Avaliação microscopia e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. **Rev. FOB**, v. 8, n. ½, p. 1-10, 2000.

SILVA, M. C. **Arcabouços quitosana/curcumina como sistema de liberação controlada para tratamento de câncer de mama**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Centro de Ciência e Tecnologia. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 180p, 2015.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 455-462, 2006.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K.; MITTAL, S.; YADAV, S. Chemical composition of essential oil from leaves of *Chenopodium ambrosioides* from Chandigarh, India. **Chem Nat Compd.** v. 44, n. 3, p.378-379, 2008.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M.; **J. Pharm. Pharmacol.** v. 53, n. 1047, 2001.

SINHA, A. et al. Development of calcium phosphate based bioceramics. **Bull. Mater. Sci.**, v. 24. n. 6, p. 653-657, 2001.

SOARES, G. A. S. **Biomateriais: classificação, seleção e avaliação**, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 2002.

SOUSA, J. A.; MIRANDA, E. M. **Plantas medicinais e fitoterápicos**: alternativas viáveis. Acre, 18 dez. 2003. Disponível em: <<http://www.cpa fac.embrapa.br>>. Acesso em 28 jan. 2015.

SOUSA, J. N. L. **Ação da aroeira (*schinus terebinthifolius raddi*) e do mastruz (*chenopodium ambrosioides l*) no processo de reparo de dentes de ratos reimplantados**. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Potiguar. Natal, 131f., 2010.

SOUZA, W. F. M.; OLIVEIRA, J. F. F.; NICOLETE, R. Plantas Medicinais com potencial atividade anti-inflamatória utilizadas pela população: um guia prático e ilustrativo. **Florence em Revista**. v.1, n.1, p. 1-23, 2011.

SPIEKERMANN, H.; DONATH, K.; HASSEL, T.; JOVANOVIC, S. **Implantodontia**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2000.

SPIN NETO, R. **Desenvolvimento e aplicações de biomateriais à base de quitosana para reconstrução óssea: avaliação radiográfica e histológica.** Dissertação (Mestrado em Periodontia) Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista - Júlio Mesquita Filho). Araraquara, 132f, 2008.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P., NETO, B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 61-68, 2007.

STODDART, M. **Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols** (1ªed). Totowa: Springer Protocols, 253p, 2011.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M.M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 7, p. 12-20, 2006.

TAGA, E.M. Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. **BCI.**, v. 3, n. 1, p. 30-39, 1996.

TAPONDJOU, L. A.; ADLER, C.; BOUDA, H.; FONTEM, D. A. Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles. **J Stored Prod Res.** v. 38, p. 395-402, 2002.

THARANATHAN R. N.; KITTUR F. S. Chitin – The undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 61–87, 2003.

TOLEDO FILHO, J.L.; MARZOLA, C.; RODRIGUEZ SANCHES, M.P. The bone implants and the biomaterials and the osseointegrated implants. **Rev Bras Cir Implant.**, v. 8, p. 127-43, 2001.

TONHI, E; PLEPIS, A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.

TORO, M. E. N. **Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea.** Tese (Doutorado em Ciências) - Universitat Politècnica de Catalunya, 295f., 2005.

TORRES, A. M., RICCIARDI, G. A. L., NASSIFF, A. E. A., RICCIARDI, A. I. A., BANDONI, A.L. Examen del contenido en ascaridol del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. (paico). **Facena**. v. 9, p. 27-32, 2003.

TORRES, A.R.; OLIVEIRA, R. A. G.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, E. C. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Rev. Bras. Farmacognosia**. v.15, n.4, p. 373-380, 2005.

TORRES, J. A., CHAGAS, P. M. B., SILVA, M. C., NOGUEIRA, F. G. E., CORRÊA, A. D. Caracterização de esferas de quitosana para aplicação como suporte de enzimas. IN: **XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química** – MG, 10 a 12 de Novembro de 2014, Poços de Caldas – MG.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de esferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. Associação Brasileira de Polímeros: São Carlos. v.15; n.4, p.306-312, 2005.

TRINDADE NETO, C. G. **Membranas de quitosana micro e macroporosas: preparo, caracterização e estudos de permeabilidade**. Tese (Doutorado em Química) –Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2008.

UENO, H. et al. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. **Biomaterials**, v.22, p.2125-2130, 2001. Disponível em: <http://link.periodicos.capes.gov.br/ez15.periodicos.capes.gov.br/sfx/ccl3?url_ver=Z39.88-2004>. Acesso em: 10 jul. 2015.

VALLET-REGÍ, M., GONZÁLEZ-CALBET, J.M. Calcium phosphates as substitution of bones tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 32, p. 1- 31, 2004.

VOLKMER, T. M., BREUER, D., SANTOS, L. A. Avaliação da Microestrutura de Blocos Porosos Obtidos por Gelcasting de Espumas. IN: **Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**, Agosto, 2006.

WANG, X.; MA, J.; WANG, Y.; HE, B. Bone repair in radii and tibias of rabbits with phosphorylated chitosan reinforced calcium phosphate cements. **Biomaterials**, v.23, n. 21, p.4167-4176, 2002. Disponível em: <<http://link.periodicos.capes.gov.br/ez15.periodicos.capes.gov.br>>

WANG, X.; DU, Y.; LIU, H. Preparation, Characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. **Carbohydr Polym**, v. 56, n.1, p. 21-26, 2004.

WIDU F.; DRESCHER D.; JUNKER R.; BOURAUUEL C. Corrosion and biocompatibility of orthodontic wires. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v.10, n. 5, p. 275-281, May, 1999.

YUAN, Q.; SHAH, J.; HEIN, S.; MISRA, R. D. K. Controlled and Extended Drug Release Behavior of Chitosan-Based Nanoparticle Carrier, **Acta Biomaterialia**. v. 6, n. 3, p. 1140-1148, 2010.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.
Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. p. 577-614. Editora da UFRGS.
Porto Alegre, 2004.

APÊNDICE A

Screening Fitoquímico extrato alcoólico bruto de *Dysphania ambrosioides* (L.)
Mosyakin & Clemants

NOME VULGAR: MASTRUZ SCREENING FITOQUÍMICO
 NOME BOTÂNICO: _____
 FAMÍLIA: _____
 OBSERVAÇÕES: _____

| ALCALOIDES | | | | |
|------------|------------|-------|-------------|----------------------------|
| | BOUCHARDAY | MAYER | DRAGENDORFF | ALIBO SÉLICO- TUNGSTICO |
| SEMENTE | — | — | — | — |
| FRUTO | | | | |
| FLOR | | | | |
| FOLHA | | | | |
| CASCA | | | | |
| CAULE | | | | |
| RAIZ | | | | |

| ESTEROIDES | | | |
|------------|------|------|------|
| | 0,12 | 0,25 | 0,50 |
| SEMENTE | + | + | ++ |
| FRUTO | | | |
| FLOR | | | |
| FOLHA | | | |
| CASCA | | | |
| CAULE | | | |
| RAIZ | | | |

| TANINOS | | | | | | |
|---------|---------------|-----|-----|----------------------|-----|-----|
| | GELATINA 0,5% | | | FeCl ₃ 2% | | |
| | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 0,5 | 1,0 | 2,0 |
| SEMENTE | — | — | — | — | — | — |
| FRUTO | | | | | | |
| FLOR | | | | | | |
| FOLHA | | | | | | |
| CASCA | | | | | | |
| CAULE | | | | | | |
| RAIZ | | | | | | |

| FLAVONOIDES | |
|-------------|---------------|
| | FLUORESCÊNCIA |
| SEMENTE | ++ |
| FRUTO | |
| FLOR | |
| FOLHA | |
| CASCA | |
| CAULE | |
| RAIZ | |

| SAPONINAS | |
|------------|--------|
| HEMOLÍTICO | ESPUMA |
| SEMENTE | ++ |
| FRUTO | |
| FLOR | |
| FOLHA | |
| CASCA | |
| CAULE | |
| RAIZ | |

APÊNDICE B

Análise estatística da Medida do diâmetro das esferas

Análise de variância a dois critérios fixos, considerando-se as variáveis independentes “concentração”, “desidratação”. Valores de “p” indicam a significância estatística obtida para cada critério ou interação estatística.

| Fonte de Variação | Soma dos Quadrados | df | Quadrado da Média | F | p | Poder (1-β) |
|------------------------------------|---------------------|----------|-------------------|--------------|--------------|--------------|
| Modelo Corrigido | 16,080 ^a | 7 | 2,297 | 358,508 | <0,001 | 1,000 |
| Intercept | 87,373 | 1 | 87,373 | 13635,829 | <0,001 | 1,000 |
| Concentração | 0,332 | 3 | 0,111 | 17,280 | <0,001 | 1,000 |
| Desidratação | 15,655 | 1 | 15,655 | 2443,180 | <0,001 | 1,000 |
| Concentração x Desidratação | 0,093 | 3 | 0,031 | 4,845 | 0,007 | 0,867 |
| Erro | 0,205 | 32 | 0,006 | | | |
| Total | 103,659 | 40 | | | | |
| Total Corrigido | 16,285 | 39 | | | | |

a. $R^2 = 0,987$ (R^2 ajustado = 0,985)

APÊNDICE C

Análise estatística do Ensaio de Biodegradação Enzimática *in vitro*

Análise de variância a três critérios fixos, considerando-se as variáveis independentes “concentração”, “tempo” e “presença de lisozima”. Valores de “p” indicam a significância estatística obtida para cada critério ou interação estatística.

| Fonte de Variação | Soma dos Quadrados | df | Quadrado da Média | F | p | Poder (1-β) |
|--|--------------------|-----------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| Modelo Corrigido | 0,026 ^a | 47 | 0,001 | 11,965 | <0,001 | 1,000 |
| Intercept | 0,016 | 1 | 0,016 | 338,350 | <0,001 | 1,000 |
| Concentração | 0,000 | 3 | 0,000 | 1,622 | 0,189 | 0,414 |
| Tempo | 0,005 | 5 | 0,001 | 21,796 | <0,001 | 1,000 |
| Presença de Lisozima | 0,008 | 1 | 0,008 | 168,516 | <0,001 | 1,000 |
| Concentração × Tempo | 0,002 | 15 | 0,000 | 2,735 | 0,002 | 0,989 |
| Concentração × Presença de Lisozima | 0,000 | 3 | 0,000 | 2,050 | 0,112 | 0,511 |
| Tempo × Presença de Lisozima | 0,008 | 5 | 0,002 | 36,468 | <0,001 | 1,000 |
| Concentração × Tempo × Presença de Lisozima | 0,002 | 15 | 0,000 | 3,366 | <0,0001 | 0,998 |
| Erro | 0,004 | 96 | 0,000 | | | |
| Total | 0,046 | 144 | | | | |
| Total Corrigido | 0,030 | 143 | | | | |

a. $R^2 = 0,854$ (R^2 ajustado = 0,783)

APÊNDICE D

Análise estatística do Ensaio de Compressão

Análise de variância a um critério fixo, considerando-se a variável independente “concentração”. Valores de “p” indicam a significância estatística obtida para cada critério.

| | | Soma dos | df | Quadrado | F | p | Poder |
|--|--------------|------------------|-----------|-----------------|--------------|--------------|--------------|
| | | quadrados | | da Média | | | (1-β) |
| Máxima Carga Compressiva | Entre Grupos | 1152,498 | 3 | 384,166 | | | |
| | Intra Grupos | 424,693 | 8 | 53,087 | 7,237 | 0,011 | 0,873 |
| | Total | 1577,191 | 11 | | | | |
| Deformação Compressiva em Máxima Carga Compressiva | Entre Grupos | 12,188 | 3 | 4,063 | | | |
| | Intra Grupos | 17,451 | 8 | 2,181 | 1,862 | 0,214 | 0,318 |
| | Total | 29,639 | 11 | | | | |